

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN UBI JALAR UNGU
(*Ipomoea batatas L.lam*) TERHADAP EKSPRESI TNF- α
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI KOLON TIKUS
(*Rattus novergicus*) MODEL INFLAMMATORY
BOWEL DISEASE YANG DIINDUKSI
INDOMETASIN**

SKRIPSI

Oleh :

**RESTIFA ARGIANDANI
145130100111014**



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN UBI JALAR UNGU
(*Ipomoea batatas L.lam*) TERHADAP EKSPRESI TNF- α
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI KOLON TIKUS
(*Rattus novergicus*) MODEL INFLAMMATORY
BOWEL DISEASE YANG DIINDUKSI
INDOMETASIN**

SKRIPSI

*Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan*

Oleh :

**RESTIFA ARGINDANI
145130100111014**



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL DAUN UBI JALAR UNGU
(*Ipomoea batatas L.lam*) TERHADAP EKSPRESI TNF- α
DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI KOLON TIKUS
(*Rattus novergicus*) MODEL *INFLAMMATORY
BOWEL DISEASE* YANG DIINDUKSI
INDOMETASIN**

Oleh:

RESTIFA ARGHANDANI

145130101111014

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji
pada tanggal 06 Juni 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr.Drs. Agung Pramana W.M,M.Si

NIP. 196506161991111001

drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet

NIK. 19880518 201504 1 003

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Restifa Argiandani
NIM : 145130100111014
Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan
Penulis Skripsi berjudul : **Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) terhadap Ekspresi TNF- α dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi Indometasin**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Desember 2017

Yang menyatakan,

Restifa Argiandani

NIM. 145130100111014

**Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.Lam*)
Terhadap Ekspresi TNF- α dan Gambaran Histopatologi Kolon
Tikus (*Rattus novergicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease*
yang diinduksi Indometasin**

ABSTRAK

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan inflamasi yang menyerang saluran cerna seperti usus halus, lambung dan kolon. Penyakit ditandai dengan adanya inflamasi yang menyebabkan adanya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Indometasin merupakan salah satu obat golongan NSAID (*Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) yang dapat memperparah keadaan tersebut. Ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) dapat digunakan sebagai terapi pada hewan model tikus IBD. Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui ekspresi TNF- α dan perubahan gambaran histopatologi kolon pada hewan model tikus IBD. Hewan model tikus IBD dihasilkan dengan pemberian Indometasin 15 mg/kg BB secara per oral dengan melalui sonde lambung. Penelitian ini dilakukan menggunakan lima kelompok tikus (*Rattus novergicus*), yaitu kelompok I adalah kontrol negatif, kelompok II adalah kontrol positif, kelompok III adalah terapi dosis 600 mg/kg BB, kelompok IV adalah terapi dosis 700mg/kg BB, dan kelompok V adalah terapi dosis 800 mg/kg BB. Penentuan ekspresi TNF- α dilakukan dengan menggunakan teknik Imunohistokimia dan pengamatan histopatologi organ kolon menggunakan mikroskop cahaya (*Olympus BX15*). Sementara hasil pengamatan histopatologi kolon berdasarkan gambaran infiltrasi sel radang dan erosi epitel yang dianalisa secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 800 mg/kg BB efektif untuk terapi *Inflammatory Bowel Disease* yang ditandai dengan penurunan ekspresi TNF- α dan perbaikan mukosa kolon.

Kata kunci : Daun ubi Jalar Ungu, *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), TNF- α ,

infiltrasi sel radang

The Influence Ethanol Extracts of Purple Sweet Potato Leaves (*Ipomoea batatas* L.lam) Against Expression of TNF- α and Histopatology of Colon in Rats (*Rattus novergicus*) Model of *Inflammatory Bowel Disease* Induced by Indomethacin

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is an inflammation in gastrointestinal track such as intestine, stomach and colon. The disease is characterized inflammation that cause increase of ROS (*Reactive Oxygen Species*). Indomethacin is one of NSAID (*Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) that can aggravate this situation. Ethanol extracts of purple sweet potato leaves (*Ipomoea batatas* L.lam) can be used as therapy in animal model of *Inflammatory Bowel Disease (IBD)*. This research is used to know about expression of TNF- α and histopathology in colon rats (*Rattus novergicus*). Animal model of *Inflammatory Bowel Disease* induced by Indomethacin 15 mg/kg BW per oral. This research uses 5 groups rats (*Rattus novergicus*). Group I is negative control, group II is positive control, group III is therapy dose 600 mg/kg BW, group IV is therapy dose 700 mg/kg BW, and group V is therapy dose 800 mg/kg BW. Determination of expression TNF- α use technique immunohistochemistry. Immunohistochemistry and observation histopatology of colon use light microscopy (*Olympus BX15*). Based on the observations, in histopathology of colon there are infiltrating inflammatory cells and epithelial erosion which descriptive analyzed. The results showed that ethanol extract of purple sweet potato leaves with a dose of 800 mg/kg effective therapy for *Inflammatory Bowel Disease* characterized by decreased expression of TNF- α and the repair of colonic mucosa.

Keyword : Purple sweet potato leaves, *Inflammatory Bowel Disease (IBD)*, TNF- α , infiltration cells

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas berkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L. lam*) Terhadap Ekspresi TNF- α dan Gambaran Histopatologi Kolon Tikus (*Rattus novergicus*) Model *Inflammatory Bowel Disease* yang Diinduksi Indometasin”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Atas terselesaikannya proposal skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.Drs. Agung Pramana Warih Marhendra M.Si dan drh. Viski Fitri Hendrawan, M.Vet., sebagai dosen pembimbing atas bimbingan, nasihat, saran dan segala perhatian yang telah diberikan selama penyusunan skripsi ini.
2. drh.Wawid Purwatiningsih, M.Vet dan drh.Fidi Nur Aini EPD, M.Si sebagai dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran selama pelaksanaan ujian skripsi.
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
4. Keluarga penulis, Ayah Suharta, Ibunda Endang Tri Rahayu, dan Adik Bagas Adi Nurcholis atas segala pengorbanan, doa, materi dan kasih sayang yang tak terhingga kepada penulis.

5. Kelompok penelitian “Daun Ubi Jalar Ungu” yang telah memberi masukan, dorongan, semangat, dan pengetahuan yaitu Febrina Niken L., Hanun Sabilah, Desy Setyoningsih dan Davinci Oswald yang telah memberi masukan, motivasi dan semangat selama proses penulisan skripsi kepada penulis dan anggota kelas BRAVE yang telah menemani proses belajar selama 4 tahun masa pendidikan dokter hewan serta Dina Hardiana S.Kh yang memberikan saran dan semangat selama proses penulisan dan berjalannya skripsi.

Akhir kata penulis berharap semoga Allah S.W.T membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis, dan semoga Skripsi ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca.

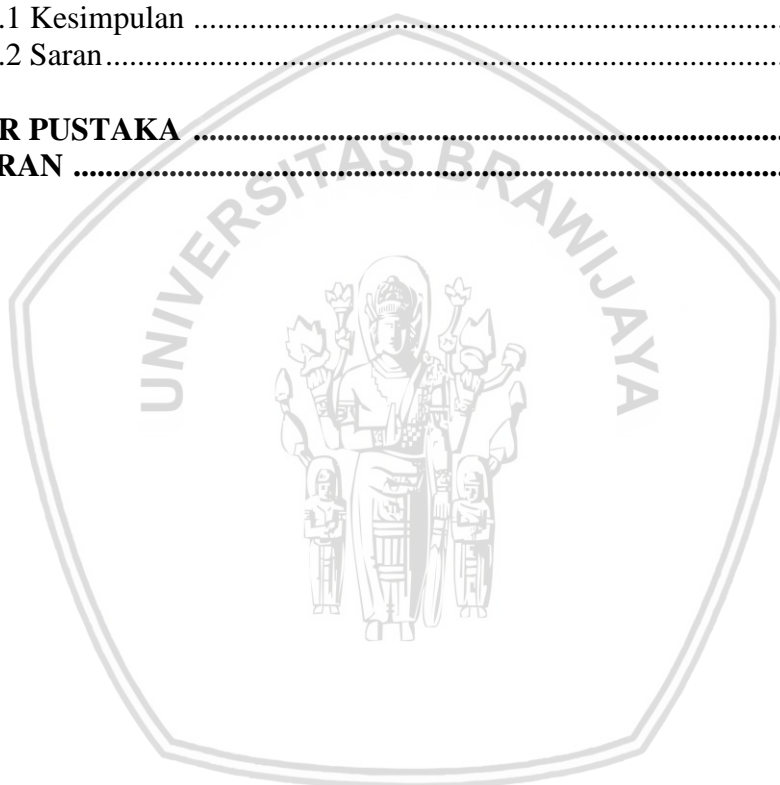
Malang, Desember 2017

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xi
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1 <i>Inflammatory Bowel Disease (IBD)</i>	5
2.2 Indometasin	6
2.3 Daun Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas L.lam</i>)	8
2.3.1 Taksonomi dan Persebaran	8
2.3.2 Morfologi	9
2.3.3 Kandungan	9
2.3.4 Antioksidan dan Antiinflamasi Daun ubi jalar ungu.....	10
2.4 Histopatologi Kolon	11
2.5 <i>Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α)</i>	13
2.6 Klasifikasi Tikus putih (<i>Rattus novergicus</i>).....	16
 BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	 18
3.1 Kerangka Konsep	18
3.2 Hipotesis Penelitian	21
 BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	 22
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22
4.2 Alat dan Bahan	22
4.3 Rancangan Penelitian	23
4.4 Variabel Penelitian	24
4.5 Prosedur Kerja	25
4.5.1 Persiapan Hewan Coba.....	25
4.5.2 Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu (<i>Ipomoea batatas L.lam</i>).....	25
4.5.3 Pemberian Indometasin	26
4.5.4 Pengambilan Organ Kolon	26
4.6 Histopatologi Kolon	27

4.6.1 Pembuatan Preparat Histopatologi Kolon	28
4.6.2 Pewarnaan <i>Hematoksin Eosin</i> (HE)	38
4.6.3 Pengamatan Histopatologi	29
4.7 Penentuan Ekspresi TNF- α dengan Teknik <i>Immunohistokimia</i>	30
4.8 Analisa data	31
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	32
5.1 Pengaruh Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu Histopatologi	32
5.2 Pengaruh Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu (TNF- α) Kolon Kolon	41
BAB VI PENUTUP	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran	51
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	56



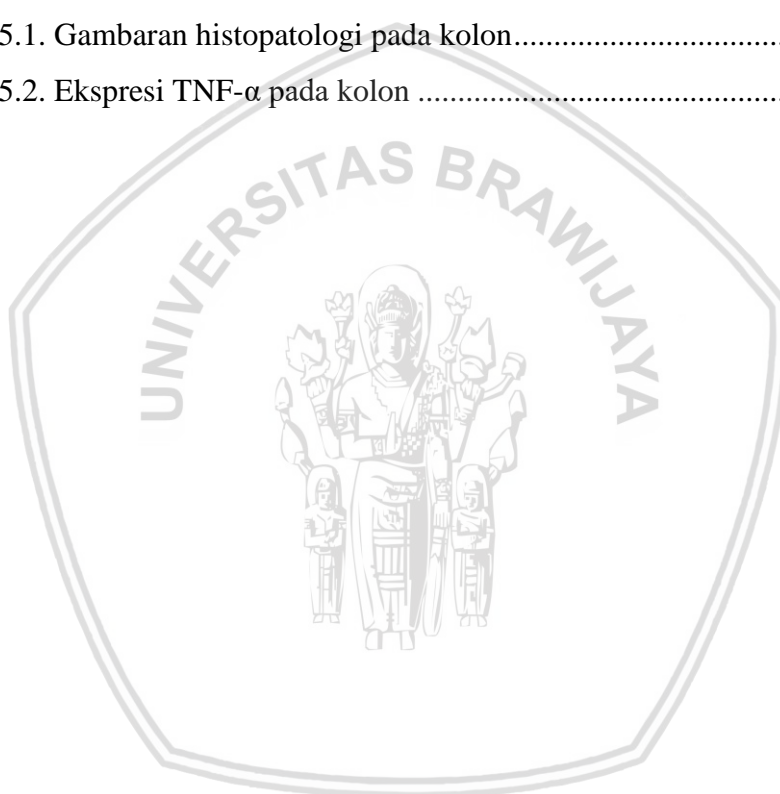
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 2.1 Kandungan daun ubi jalar ungu/100 gr.....	10
Tabel 4.1 Rancangan kelompok penelitian	24
Tabel 5.1 Ekspresi TNF- α kolon tikus putih.....	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1 Mekanisme <i>NSAID</i>	7
Gambar 2.2 Daun Ubi Jalar Ungu	9
Gambar 2.3 Histologi kolon.....	12
Gambar 2.4. Histopatologi kolon.....	13
Gambar 2.5 Mekanisme aktivasi $\text{TNF-}\alpha$	15
Gambar 5.1. Gambaran histopatologi pada kolon.....	34
Gambar 5.2. Ekspresi $\text{TNF-}\alpha$ pada kolon	42



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
IBD	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
COX-1	Siklooksigenase-1
COX-2	Siklooksigenase-2
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflammatory Bowel Disease (IBD) adalah suatu penyakit yang menunjukkan inflamasi pada saluran cerna (Frolkis, 2013). Penyakit IBD dapat terjadi pada manusia dan hewan. Pada manusia, penyakit IBD terjadi berkisar 70-150 kasus per 100.000 individu di Amerika Serikat. Di Indonesia, belum ada studi epidemiologi mengenai penyakit IBD. Data kasus IBD didapatkan berdasarkan laporan rumah sakit daerah. Secara global, tingkat kejadian penyakit IBD pada manusia adalah 10 kasus per 100.000 penduduk (Firmansyah, 2013). Pada hewan, terdapat 572 kasus IBD pada anjing dari tanggal 1 Agustus 2003 sampai dengan 31 Desember 2009 dari catatan medis Queen Mother Hospital for Animals (Kathrani *et al.*, 2011).

Secara umum, terdapat beberapa penyebab penyakit IBD salah satunya adalah penggunaan NSAIDs (*Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) (Frolkis, 2013). Salah satu contoh NSAIDs adalah Indometasin. Indometasin sering digunakan untuk pengobatan rheumatid arthritis. Mekanisme kerja Indometasin adalah dengan menghambat siklooksigenase 1 (COX-1) dan siklooksigenase 2 (COX-2) yang berfungsi sebagai pertahanan mukosa kolon (Takeuchi *et al.*, 2003). Pemberian Indometasin 15 mg/kg BB dapat menyebabkan adanya aktivitas makrofag yang melepaskan radikal bebas (*Reactive Oxygen Species*). Adanya peningkatan produksi ROS dapat menyebabkan adanya aktivasi NF- κ B. Aktivasi NF- κ B akan mengakibatkan sekresi sitokin pro-inflamasi yaitu TNF- α . Peningkatan produksi

TNF- α menyebabkan terjadinya inflamasi dan adanya kerusakan jaringan kolon (Tian *et al.*, 2017).

Pengobatan IBD yang selama ini dilakukan adalah pemberian immunosupresan dan imunomodulator (Vezza *et al.*, 2016). Di sisi lain, terdapat pengobatan alternatif lain yang aman dan efektif untuk IBD yaitu penggunaan antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*). Antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen adalah enzim-enzim yang bersifat antioksidan misalnya SOD (*Superoksida Dismutase*), katalase dan glutathione peroksidase sedangkan antioksidan eksogen adalah antioksidan yang didapatkan dari kandungan berbagai tumbuhan seperti vitamin C, organosulfur, vitamin E (Werdhasari, 2014).

Antioksidan eksogen yang banyak ditemui adalah flavonoid yang terkandung dalam daun ubi jalar ungu. Jenis flavonoid yang terkandung di dalam daun ubi jalar ungu adalah antosianin. Antosianin merupakan pigmen warna merah keunguan. Kandungan antosianin pada daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) memiliki kandungan yang lebih tinggi dibandingkan daun ubi jalar yang lain. Pada penelitian yang dilakukan oleh Huang *et al.*, (2014) daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) memiliki kandungan antosianin sebesar $0,43-2,90 A_{530}-0.333A_{657}/m^2$, daun ubi jalar hijau dan ubi jalar kuning sebesar $0 A_{530}-0.333A_{657}/m^2$ Sebagai antioksidan, antosianin akan menyumbangkan elektron pada ROS (*Reactive Oxygen Species*) untuk membentuk senyawa yang lebih stabil sedangkan sebagai antiinflamasi

antosianin akan menginaktivasi NF- κ B sehingga TNF- α yang merupakan sitokin pro-inflamasi tidak terbentuk (Miguel, 2011). Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) dalam menurunkan ekspresi TNF- α dan perbaikan gambaran histopatologi kolon tikus model IBD.

1.2 Rumusan Masalah

Berikut ini adalah rumusan masalah berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan :

1. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) terhadap gambaran histopatologi kolon pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* yang di induksi Indometasin?
2. Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) terhadap ekspresi TNF- α tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* yang di induksi Indometasin?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada masalah :

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar, dengan umur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 150-200 gram.
2. Daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) diperoleh dari BALITKABI (Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi) di Malang sedangkan pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dilakukan di Laboratorium

Farmakologi dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Dosis yang diberikan 600mg /kgBB/hari (Terapi I), 700mg/kgBB/hari (Terapi II), dan 800mg/kgBB/hari (Terapi III) selama 7 hari, dengan menggunakan sonde lambung.

3. Indometasin yang digunakan adalah Indometasin dengan dosis 15mg/kg BB
4. Variabel yang diukur dalam penelitian ini adalah ekspresi TNF- α dan pengamatan histopatologi kolon secara kualitatif menggunakan mikroskop.

1.4 Tujuan Penelitian

Berikut ini adalah tujuan penelitian berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) pada gambaran histopatologi kolon pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang di induksi Indometasin model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD).
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) terhadap ekspresi TNF- α kolon pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang di induksi Indometasin model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD).

1.5 Manfaat

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah dapat mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) pada gambaran histopatologi dan ekspresi TNF- α organ kolon tikus (*Rattus norvegicus*) yang di induksi Indometasin model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Inflammatory Bowel Disease (IBD)*

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan inflamasi yang terjadi pada saluran cerna. Secara umum, penyakit IBD dibagi menjadi dua jenis yaitu *Chron's Disease (CD)* dan *Ulcerative Colitis (UC)*. *Chron's Disease (CD)* adalah inflamasi yang terjadi pada usus halus sedangkan *Ulcerative Colitis (UC)* adalah inflamasi yang terjadi pada usus besar (Cerquetalla *et al.*, 2010). *Inflammatory Bowel Disease (IBD)* memiliki beberapa gejala klinis yaitu penurunan berat badan, diare, rasa sakit pada abdomen, letargi, dan penurunan nafsu makan. Beberapa gejala klinis dari penyakit *Inflammatory Bowel Disease (IBD)* disertai dengan keadaan stress (Hall, 2009).

Inflammatory Bowel Disease (IBD) belum diketahui secara pasti penyebabnya, namun menurut Frolkis (2013) terdapat beberapa faktor yang dapat menyebabkan terjadinya *Inflammatory Bowel Disease (IBD)* salah satunya adalah penggunaan NSAIDs (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*). NSAIDs (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) merupakan obat-obatan sebagai antiinflamasi. Penggunaan NSAIDs (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) dapat menghambat produksi siklooksigenase (COX-1) dan (COX-2). Terhambatnya produksi siklooksigenase (COX-1) dan (COX-2) akan menghambat produksi prostaglandin (PGE₂) yang mengakibatkan produksi mukus berkurang. Produksi mukus yang berkurang akan mengakibatkan perlindungan terhadap mukosa kolon menurun (Takeuchi *et al.*, 2003).

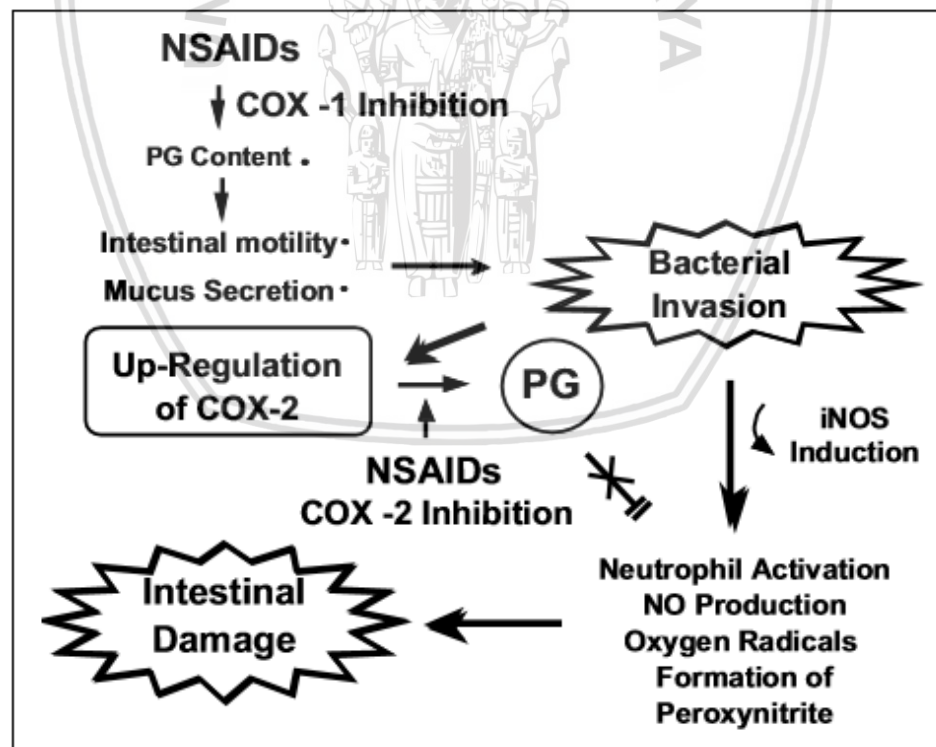
Patogenesis *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yaitu antigen pada mukosa usus yang menyebabkan kerusakan pada mukosa. Antigen tersebut dikenali oleh APCs (*Antigen-Presenting Cells*). Adanya pengenalan antigen oleh APCs (*Antigen-Presenting Cells*) akan mengakibatkan produksi sel T yang mengakibatkan adanya respon inflamasi. Respon inflamasi akan menginduksi beberapa sitokin. Sitokin selanjutnya akan mengaktifkan makrofag yang melepaskan mediator inflamasi ROS (*Reactive Oxygen Species*). Pelepasan mediator inflamasi akan menyebabkan inflamasi sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan kolon (Solanki *et al.*, 2010).

2.2 Indometasin

Indometasin adalah salah obat yang termasuk ke dalam golongan NSAIDs (*Non-Steroid Anti-Inflammation Drugs*) yang digunakan sebagai obat anti inflamasi pada tubuh. NSAIDs (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) digunakan untuk pengobatan beberapa penyakit (Taiwo, 2008). Penggunaan NSAIDs (*Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*) dapat menimbulkan efek samping yaitu toksisitas pada gastrointestinal termasuk pembentukan erosi, perdarahan pada saluran pencernaan atas. Efek samping lainnya yaitu dapat mengakibatkan kolitis dan inflamasi usus halus (Klein dan Eliakim, 2010).

Indometasin akan diserap oleh sel epitel yang menghambat produksi dua enzim yaitu enzim siklooksienase-1 (COX-1) dan siklooksigenase-2 (COX-2). Penghambatan terhadap enzim (COX-1) dan (COX-2) akan menghambat produksi prostaglandin, menurunkan produksi mukus dan peningkatan motilitas usus. Penurunan produksi mukus akan menyebabkan perlindungan mukosa pada usus

berkurang. Selain itu Indometasin akan menghambat fosfolirasi oksidatif ATP (*Adenosin Triphosphat*) di mitokondria. Fosfolirasi oksidatif adalah proses pembentukan ATP (*Adenosin Triphosphat*) di dalam sel. Penghambatan fosfolirasi oksidasi ATP (*Adenosin Triphosphat*) akan mengakibatkan apoptosis pada sel. Sel yang mengalami apoptosis akan menghasilkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). Adanya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berlebih akan mengakibatkan keadaan stress oksidatif. Keadaan stress oksidatif di dalam jaringan akan menyebabkan peroksidasi lipid sehingga mengakibatkan kerusakan pada epitel kolon (Takeuchi *et al.*, 2003) (**Gambar 2.1**).



Gambar 2.1 Mekanisme NSAID (Takeuchi *et al.*, 2003).

2.3 Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.lam*)

2.3.1 Taksonomi dan Persebaran

Ubi jalar ungu merupakan salah satu jenis tanaman umbi-umbian di Indonesia yang menjadi sumber karbohidrat selain padi, jagung dan ubi kayu. Tanaman ubi jalar ungu merupakan salah satu umbi yang berasal dari benua Amerika. Tanaman ini selanjutnya mulai menyebar mulai abad ke-16 dan selanjutnya menyebar di seluruh dunia. Tanaman ini disebarkan oleh orang Spanyol dan Asia yaitu dari negara Filipina, Jepang dan Indonesia (Rukmana, 1997). Provinsi Jawa Barat dan Papua merupakan dua daerah yang merupakan penghasil terbesar ubi jalar di Indonesia (Samber *et al.*, 2010). Persebaran tanaman ubi jalar ungu di beberapa daerah membuat tanaman ubi jalar ungu memiliki beberapa peranan penting misalnya seperti penyediaan bahan pangan, bahan baku industri dan pakan ternak. Taksonomi daun ubi jalar ungu dapat diklasifikasikan sebagai berikut ini Zosimo (1999) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledone
Ordo	: Solanaceae
Famili	: Convolvulaceae
Genus	: <i>Ipomoea</i>
Spesies	: <i>Ipomoea batatas L.lam</i>

2.3.2 Morfologi

Ubi jalar ungu merupakan tanaman yang memiliki karakteristik merambat, daun hijau cerah dengan cukup banyak pigmen ungu di tangkai dan jari-jari daun (Anita *et al.*, 2006). Ubi jalar ungu relatif mudah didapat dan dapat tumbuh baik di daerah beriklim panas serta lembab dengan suhu maksimal 27⁰C serta lama penyinaran 11-12 jam per hari. Tanaman ini juga dapat tumbuh di ketinggian 1.000 meter dari permukaan laut (Yudiono, 2011). Keunggulan lainnya adalah memiliki produktivitas yang tinggi, serta memiliki masa tanam yang relatif pendek yaitu 3-6 bulan (George *et al.*, 2011) (**Gambar 2.2**).



Gambar 2.2 Daun Ubi Jalar Ungu (Antia *et al.*, 2006).

2.3.2 Kandungan

Beberapa bagian tanaman ubi jalar ungu memberikan fungsi fisiologis bagi tubuh salah satunya adalah bagian daun. Daun ubi jalar ungu merupakan salah bagian tanaman ubi jalar ungu yang memiliki ketersediaan yang melimpah, mudah di dapat dan pemanfaatannya belum maksimal (Dipahayu *et al.*, 2014). Daun ubi jalar ungu mengandung beberapa zat nutrisi penting. Nutrisi penting tersebut memiliki fungsi yang baik bagi tubuh. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kandungan nutrisi

seperti vitamin dan mineral pada daun ubi jalar ungu lebih banyak dibandingkan daun bayam. Daun ubi jalar ungu/ 100 gr memiliki kandungan kalsium 117 mg; besi 1,8 mg; karoten 3,5 mg; vitamin C 7,2 mg; vitamin E 1,6 mg; dan vitamin K 0,56 mg (Islam, 2003) (**Tabel 2.1**) :

Kandungan	Jumlah
Kalsium	117 mg
Besi	1,8 mg
Karoten	3,5 mg
Vitamin C	7,2 mg
Vitamin E	1,6 mg
Vitamin K	0,56 mg

Tabel 2.1 Kandungan daun ubi jalar ungu/100 gr (Islam, 2003).

2.3.3 Antioksidan dan Antiinflamasi Daun Ubi Jalar Ungu

Senyawa antioksidan banyak terdapat pada berbagai tanaman, salah satunya daun ubi jalar ungu. Daun ubi jalar ungu mengandung senyawa antioksidan yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa golongan polifenol yang banyak terdapat pada sayuran dan buah-buahan (Koncazak *et al.*, 2004). Kelompok flavonoid yang terdapat di dalam daun ubi jalar ungu adalah antosianin. Antosianin merupakan pigmen berwarna merah keunguan bersifat larut di dalam air (Nollet, 1996).

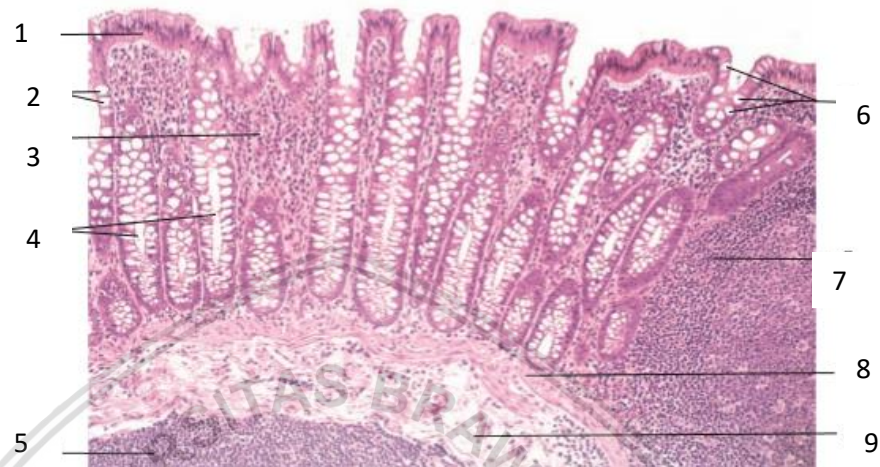
Senyawa antosianin di dalam daun ubi jalar ungu merupakan sumber antioksidan dan antiinflamasi. Antioksidan merupakan senyawa yang berperan dalam

menangkap radikal bebas yang mengakibatkan terhambatnya reaksi oksidatif dalam tubuh (Adawiyah *et al.*, 2015). Sebagai antioksidan, antosianin akan mendonorkan satu atom elektronnya pada ROS (*Reactive Oxygen Species*). Hal ini akan mengakibatkan penghentian proses kerusakan sel sehingga ROS tidak memiliki kemampuan mengambil elektron dari sel dan DNA (Sayuti dan Yenrina, 2015). Sebagai antiinflamasi, antosianin akan menginaktivasi NF- κ B. Inaktivasi NF- κ B akan mengakibatkan makrofag tidak teraktivasi dan tidak mensekresikan TNF- α sebagai sitokin pro-inflamatori (Miguel, 2011).

2.4 Histopatologi Kolon

Usus besar terdiri atas sekum, kolon dan rektum. Setiap bagian usus besar memiliki fungsi masing-masing. Sekum berfungsi sebagai tempat fermentasi pakan yang dibantu bakteri. Kolon berfungsi sebagai absorpsi air dan elektrolit dan fermentasi bahan organik yang tidak tercerna (Cunningham *et al.*, 2007). Rektum berfungsi sebagai penampungan feces sementara yang nantinya dikeluarkan anus (Boden, 2005).

Secara histologi, kolon memiliki lapisan seperti usus halus. Bagian mukosa terdiri dari epitel kolumnar simplek, glandula intestinal, lamina propria dan muskularis mukosa. Bagian submukosa terdiri dari jaringan ikat sel, pembuluh darah dan saraf sedangkan bagian muskularis eksterna tersusun atas dua lapisan otot yaitu lapis longitudinal dan lapis sirkuler. Lapis longitudinal merupakan lapisan otot bagian luar sedangkan lapis sirkuler merupakan lapisan otot bagian dalam pada (**Gambar 2.3**) (Eroschenko, 2008).

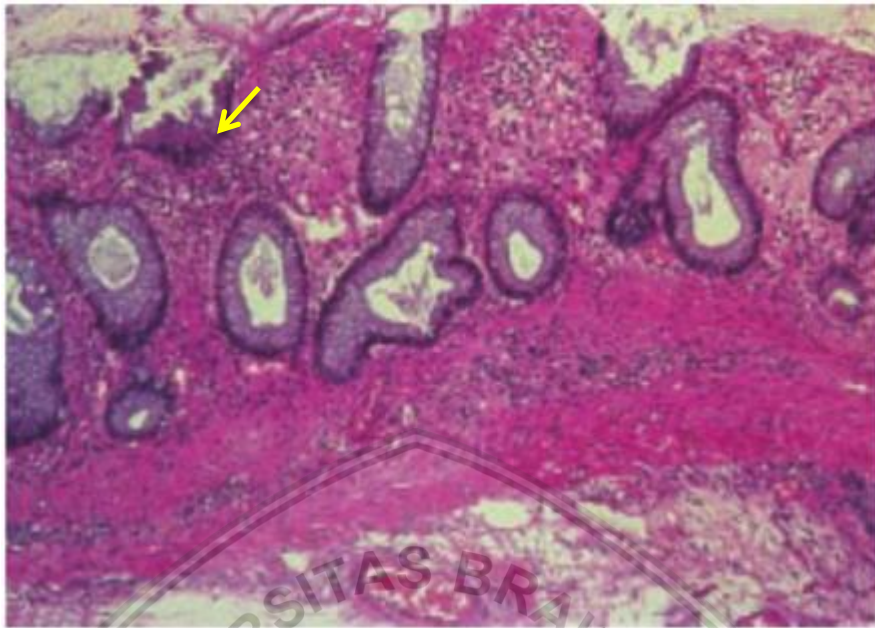


Gambar 2.3 Histologi Kolon (Eroschenko, 2008).

Keterangan

- | | |
|------------------------|----------------------|
| 1. Epitel | 6. Sel goblet |
| 2. Sel goblet | 7. Nodul limfatik |
| 3. Lamina propria | 8. Muskularis mukosa |
| 4. Glandula intestinal | 9. Tunika submukosa |
| 5. Nodul limfatik | |

Secara histopatologi, induksi Indometasin menyebabkan reaksi inflamasi. Inflamasi ditandai dengan peningkatan jumlah lamina propria (Geboes, 2003). Lamina propria tersusun atas serabut saraf, pembuluh darah, limfatik, serabut elastis, jaringan ikat longgar, sel mast serta adanya makrofag (Yeo *et al.*, 2013). Abnormalitas lainnya adalah adanya infiltrasi sel radang pada mukosa, hilangnya sel goblet dan adanya kerusakan pada bagian mukosa. Kerusakan yang terjadi tampak adanya bentuk mukosa yang tidak teratur dibandingkan dengan kondisi normal (Dellman dan Brown, 1993) (**Gambar 2.4**).



Gambar 2.4 Histopatologi kolon. Adanya perubahan pada bentuk lapisan mukosa

kolon (←)

2.5 *Tumor Necrosis Alpha (TNF- α)*

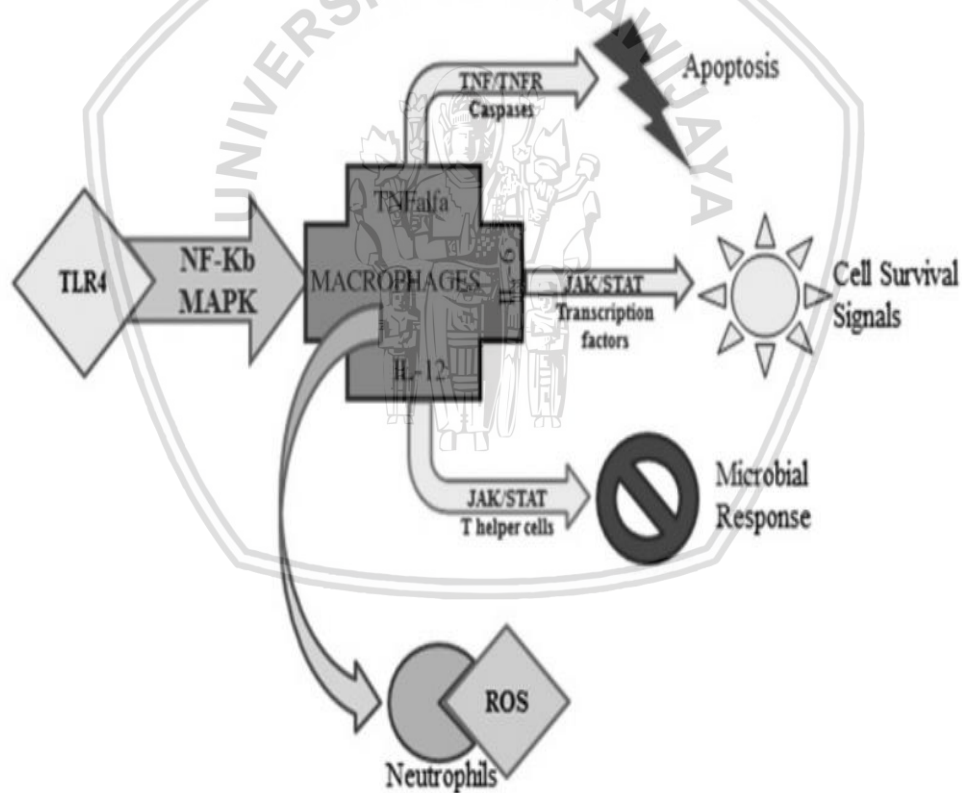
Sitokin adalah golongan protein/polipeptida yang larut dan diproduksi sel limfosit, makrofag, eosinofil, sel mast dan sel endotel. Sitokin memiliki fungsi sebagai pemberi sinyal interseluler yang mengatur proses biologis di dalam tubuh makhluk hidup. Proses biologis yang dilakukan meliputi pertumbuhan, aktivasi, proliferasi, diferensiasi, imunitas serta pertahanan jaringan. Salah satu sitokin yang berperan adalah *Tumor Necrosis Factor (TNF)*. TNF merupakan mediator utama dalam respon imun bawaan terhadap berbagai mikroorganisme penyebab infeksi. TNF memiliki dua bentuk yaitu TNF- α dan TNF- β . TNF- α (*Tumor Necrosis Alpha*) diproduksi oleh makrofag, sel T, sel B dan sel NK akibat adanya bakteri, virus dan sitokin lainnya seperti IL-1, IL-2 dan IFN- γ sedangkan TNF- β merupakan sitokin

yang disekresi oleh sel T dan sel B yang teraktiasi. TNF- β terletak di permukaan sel yang terikat pada protein transmembran LT- β (Soeroso, 2007).

Tumor Necrosis Alpha (TNF- α) merupakan sitokin pro-inflamatori yang diproduksi dan disekresikan oleh banyak sel termasuk sel imun, sel endotel, sel epitel dan sel otot polos. TNF- α (*Tumor Necrosis Alpha*) mempunyai fungsi dalam proses inflamasi yaitu meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit, mengatur aktivitas makrofag dan merangsang sitokin lainnya, Fungsi lainnya yaitu regulator dari hematopoeitik dan berperan dalam respon imun terhadap invasi bakteri, virus, jamur maupun parasit (Supit *et al.*, 2015). TNF- α memiliki dua reseptor yaitu TNF-R1 dan TNF-R2. TNF-R1 merupakan reseptor yang ditemukan pada setiap sel sedangkan TNF-R2 merupakan reseptor TNF- α yang diekspresikan oleh sel T dan sel endotel. TNF- α (*Tumor Necrosis Alpha*) akan berikatan dengan TNF-R1 sehingga dapat mengaktifkan NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*), mengatur produksi sitokin, dan inisiasi inflamasi sedangkan TNF-R2 berperan dalam respon seluler pada sel (Howerton dan Tarzami, 2017).

Mekanisme aktivasi TNF- α (*Tumor Necrosis Alpha*) diinduksi oleh NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*). NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) adalah protein faktor transkripsi yang memiliki peran penting dalam proses inflamasi termasuk perkembangan, pertumbuhan, dan proliferasi sel serta dalam kondisi patologi lainnya. Adanya antigen di dalam tubuh akan diterima oleh reseptor TLR4 (*Toll-like receptor 4*) di sel epitel usus. TLR4 (*Toll-like receptor 4*) selanjutnya akan mengaktifkan NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*), *mitogen-activated protein kinase*

(MAPK), dan makrofag. Makrofag selanjutnya akan mensekresikan sitokin pro-inflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 dan IL-12. $\text{TNF-}\alpha$ merupakan salah satu sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam sinyal apoptosis serta meningkatkan molekul adhesi neutrofil pada daerah yang mengalami kerusakan. Pada saat yang bersamaan, makrofag akan mengaktifkan neutrofil dan memproduksi sejumlah besar ROS (*Reactive Oxygen Species*) sebagai respon inflamasi pada jaringan kolon (Balmus *et al.*, 2016) (**Gambar 2.4**).



Gambar 2.4 Mekanisme aktivasi $\text{TNF-}\alpha$ (Balmus *et al.*, 2016).

2.6 Klasifikasi Tikus (*Rattus norvegicus*)

Klasifikasi taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut (Baker, 1979) :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Class	: Mammalia
Order	: Rodentia
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Hewan coba adalah hewan model yang digunakan untuk mempelajari dan mengembangkan berbagai bidang ilmu pengetahuan. Hewan tersebut harus memiliki persyaratan tertentu sehingga mampu dijadikan sebagai sarana berbagai penelitian (Sulaksono *et al.*, 1986). Persyaratan yang diperlukan adalah persyaratan genetik, lingkungan yang sesuai dan reaksi biologis (Subahagio *et al.*, 1997).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah hewan yang sengaja dikembangbiakkan sebagai hewan coba. Tikus putih digunakan sebagai hewan coba dikarenakan berbagai pertimbangan. Pertimbangan tikus putih sebagai hewan coba adalah memiliki beberapa keunggulan yaitu mudah dipelihara, memiliki morfologi organ tubuh yang analog dengan manusia dan mudah berkembang biak (**Gambar 2.5**) (Molole *et al.*, 1989). Selain itu, tikus putih memiliki keunggulan lain seperti potensi reproduksi yang tinggi, masa bunting yang pendek (Sirois, 2005).



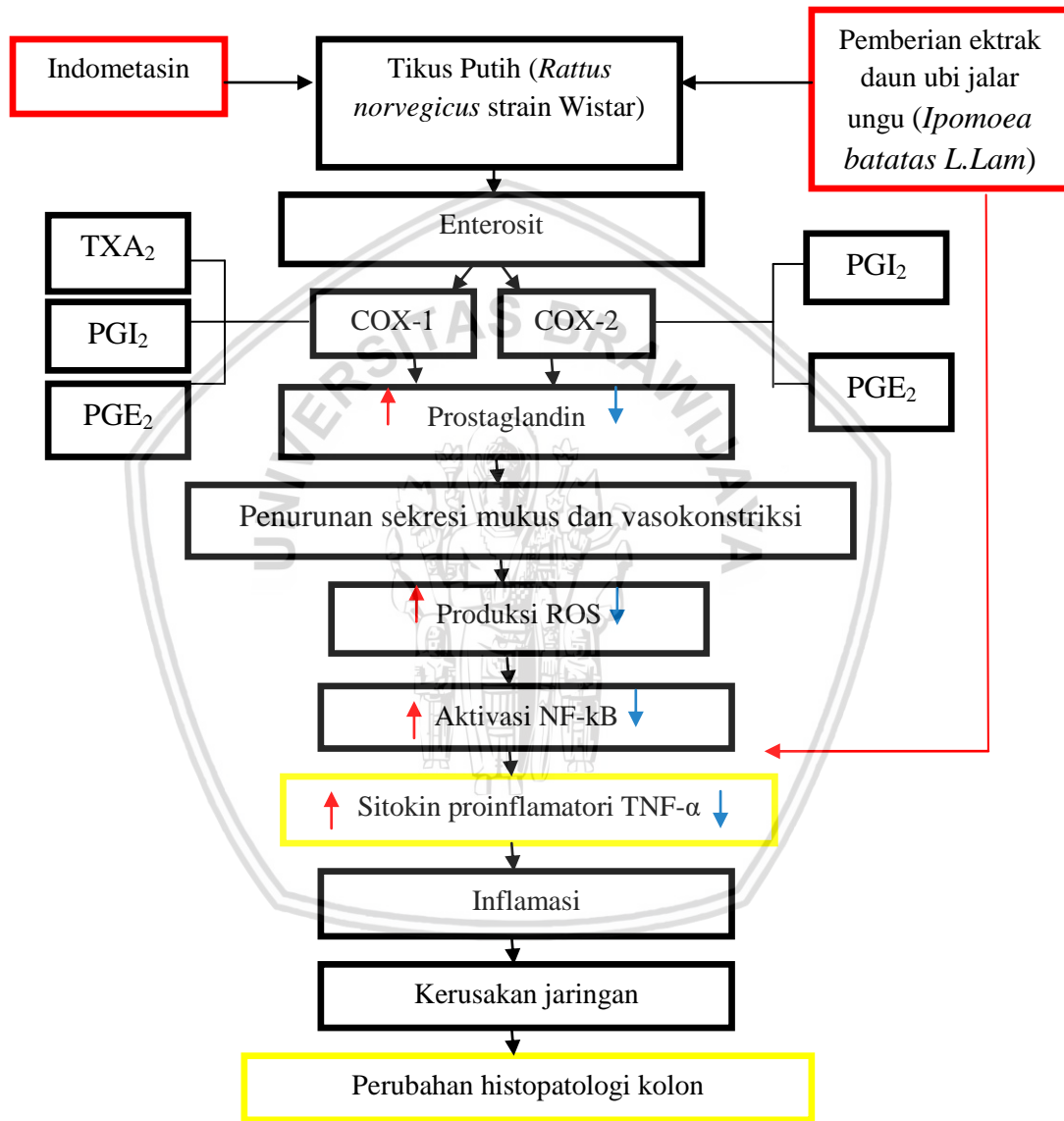
Gambar 2.5 Tikus (*Rattus norvegicus*) (Krinke, 2000).

Penelitian dilakukan dengan menginduksi tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan Indometasin untuk pembuatan hewan model *Inflammatory Bowel Disease*. Indometasin merupakan salah satu obat golongan NSAID (*Non-Steroidal Inflammatory Drugs*) yang mampu menekan inflamasi namun apabila diberikan dalam jangka waktu yang panjang memiliki efek samping inflamasi pada saluran cerna (Higuchi *et al.*, 2009).

Pemberian Indometasin dilakukan secara per oral menggunakan sonde lambung dengan dosis 15 mg/kg BB (Aulanni'am *et al.*, 2012). Efek pemberian Indometasin akan mengakibatkan penurunan produksi mukus pada kolon sehingga akan mengganggu keseimbangan mikroflora. Ketidakseimbangan ini akan menyebabkan adanya inflamasi pada saluran gastrointestinal salah satunya adalah kolon. Keadaan inflamasi tersebut akan mengakibatkan terjadinya penyakit *Inflammatory Bowel Disease* (IBD). Induksi IBD (*Inflammatory Bowel Disease*) menggunakan Indometasin dilakukan selama 24 jam (Aulanni'am *et al.*, 2012).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



⊥ : Menghambat

□ : Parameter

↑ : Peningkatan

□ : Variabel bebas

↓ : Penurunan

Induksi Indometasin 15mg/kg BB pada hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) akan menyebabkan *Inflammatory Bowel Disease* (IBD). Indometasin dengan dosis 15 mg.kg BB masuk ke dalam tubuh selanjutnya diserap oleh sel epitel kolumnar simplek kolon. Bagian membran sel tersebut selanjutnya akan melepaskan asam arakidonat yang terdapat di dalam membran. Pelepasan asam arakidonat yang terdapat di dalam membran sel dibantu oleh enzim *Phospholipase A₂*. Asam arakidionat selanjutnya direduksi oleh enzim siklooksigenase menjadi Prostaglandin H₂ (PGH₂). COX-1 akan memetabolisme Prostaglandin H₂ (PGH₂) menjadi TXA₂, PGI₂, PGE₂. TXA₂ berperan dalam agregarsi trombosit dan vasokonstriksi, PGI₂ berperan dalam vasodilator, menghambat agrerasi trombosit, dan homeostasis renal, PGE₂ berperan dalam peningkatan mukus, penurunan asam lambung. Enzim siklooksigenase 2 (COX-2) akan memetabolisme Prostaglandin H₂ (PGH₂) menjadi PGE₂ yang berperan sebagai agen piretik serta menurunkan penyerapan natrium dan air pada ginjal dan PGI₂ yang berperan dalam vasodilator dan penghambatan agregasi trombosit (Justice dan Carruthers, 2005).

Pemberian Indometasin akan mengakibatkan penghambatan terhadap enzim COX-1 dan COX-2 sehingga menyebabkan terhambatnya produksi Prostaglandin H₂ (PGH₂). Penghambatan enzim COX-1 akan menyebabkan terhambatnya produksi TXA₂, PGI₂, serta PGE₂ yang menyebabkan peningkatan asam lambung, penurunan sekresi mukus yang menyebabkan perlindungan mukosa hilang. Hal ini akan menyebabkan kerusakan mukosa (Suleyman *et al.*, 2007). Penghambatan terhadap enzim COX-2 akan menyebabkan terhambatnya produksi PGI₂ dan PGE₂ yang

mengakibatkan vasokonstriksi dan tidak terjadinya penghambatan agregasi trombosit (Justice dan Carruthers, 2005).

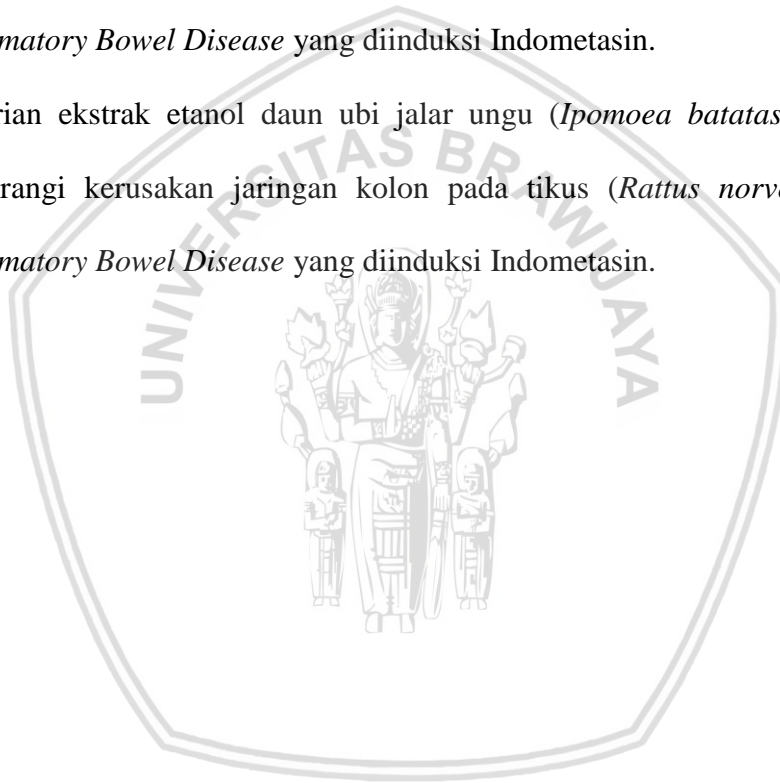
Adanya perlindungan usus yang hilang akan menyebabkan ketidakseimbangan mikroflora. Hal ini akan menyebabkan mikroflora masuk dan menyebabkan terjadinya interaksi antara mukosa dan mikroflora sebagai antigen. Antigen selanjutnya dikenali oleh *Toll-Like Reseptor* (TLRs) di permukaan enterosit. *Toll-Like Reseptor* (TLRs) akan mengaktifkan NF- κ B yang menginduksi makrofag untuk mensekresikan TNF- α , IL-6, dan IL-12. TNF- α akan berperan dalam apoptosis, IL-6 akan menginduksi pertahanan sel melalui jalur JAK/STAT, IL-12 akan menginduksi aktivasi sel T. Pada saat bersamaan, neutrofil akan aktif dan memproduksi sejumlah *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berperan dalam proses inflamasi (Balmus *et al.*, 2016).

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberikan daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) yang memiliki kandungan antioksidan yaitu flavanoid. Flavanoid yang terkandung di dalam daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) adalah antosianin. Antosianin merupakan pigmen warna merah keunguan yang terdapat di dalam daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*). Antosianin akan berperan mengobati kerusakan organ dalam tubuh serta mencegah terbentuknya radikal bebas. Antosianin akan memblok aktivasi NF- κ B sehingga mengakibatkan makrofag tidak mensekresikan TNF- α . Flavanoid juga berperan menekan aktivasi neutrofil yang nantinya menghasilkan radikal bebas, sehingga diharapkan ekspresi TNF- α dan kerusakan organ dapat dicegah..

3.2 Hipotesis Penelitian

Berikut ini adalah hipotesis penelitian berdasarkan rumusan masalah yang telah ada:

1. Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) dapat berpengaruh terhadap ekspresi TNF- α pada kolon tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi Indometasin.
2. Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) dapat mengurangi kerusakan jaringan kolon pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi Indometasin.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan bulan Maret 2018 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) dan pemeliharaan, perlakuan serta euthanasi hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembuatan preparat histopatologi kolon dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu kandang tikus berupa bak plastik dan tutup kandang dari kawat, botol minum tikus, sekam berupa parutan kayu halus, tempat pakan tikus, alat sonde, *dissecting set*, papan bedah, sarung tangan, papan bedah, timbangan digital, gelas ukur, cawan petri, spatula, *objek glass*, *cover glass*, mikroskop cahaya (Olympus BX51), pot organ, *tissue*, kapas, *box* pakan dan lemari pendingin.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan tikus standar, ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*), Indometasin, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), aquades, NaCl fisiologis, antibodi primer (*Rat Anti TNF- α*), Antibodi

sekunder, alkohol (70%, 80%, 90% dan 95%), etanol (70%, 80%, 90% dan 95%), xylol I-II, *Neutral Buffered Formaline*, paraffin blok, pewarna *hematoxyline eosin*, 1 % BSA (Bovine Serum Albumin), SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*), DAB (*Diamino Benzidine*), PBS (*Phosphat Buffer Saline*), 3% hidrogen peroksida.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena media yang digunakan dalam penelitian ini dianggap sama atau seragam (Kusriningrum, 2008). Hewan coba dalam penelitian ini dibagi menjadi lima kelompok perlakuan. Kelompok pertama adalah kontrol negatif dimana tikus hanya diberi pakan dan air minum. Kelompok kedua adalah kontrol positif dimana tikus diinduksi dengan Indometasin 15 mg/ekor/hari. Kelompok A, B, dan C merupakan kelompok terapi dimana tikus diinduksi dengan Indometasin kemudian diberi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 600 mg/kgBB/hari, 700 mg/kgBB/hari, 800 mg/kgBB/hari.

Berikut ini merupakan perhitungan banyaknya ulangan yang dibutuhkan berdasarkan rumus $p(n-1) \geq 15$, dimana (p) adalah jumlah kelompok perlakuan dan (n) adalah jumlah ulangan (Kusriningrum, 2008).

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan diatas diperoleh jumlah ulangan lebih dari atau sama dengan empat kali untuk setiap kelompok perlakuan dengan jumlah kelompok perlakuan sebanyak lima kelompok sehingga dibutuhkan sebanyak 20 ekor hewan coba. Berikut ini adalah tabel rancangan kelompok penelitian:

Tabel 4.1 Rancangan Kelompok Penelitian

PERLAKUAN	ULANGAN			
	1	2	3	4
Kelompok Kontrol Negatif				
Kelompok Kontrol Positif Induksi Indometasin 15 mg/Kg BB				
Kelompok A (Terapi 1) Induksi Indometasin 15mg/kg BB + ekstrak etanol daun ubi jalar ungu 600 mg/kg BB				
Kelompok B (Terapi 2) Induksi Indometasin 15 mg/kg BB + ekstrak etanol daun ubi jalar ungu 700 mg/kg BB				
Kelompok C (Terapi 3) Induksi Indometasin 15 mg/kg BB + ekstrak etanol daun ubi jalar ungu 800 mg/kg BB				

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini, yaitu :

- Variabel bebas : dosis ekstrak daun ubi jalar ungu dan dosis Indometasin.
- Variabel terikat : ekspresi TNF- α dan histopatologi kolon tikus putih
- Variabel kontrol : tikus putih (*Rattus novergicus*) strain Wistar
(jenis kelamin, umur, berat badan), pakan, suhu, kandang.

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan sebanyak 20 ekor dan dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dengan masing-masing perlakuan terdiri dari empat ekor hewan coba. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari agar hewan coba beradaptasi dengan lingkungan baru. Selama masa aklimatisasi hewan coba diberi pakan standar berupa pelet yang mengandung karbohidrat 5%, protein 10%, lemak 3%, vitamin, mineral dan air sebesar 12% (AOAC, 2005). Tikus diberi pakan sekali sehari, yaitu pada pagi hari serta air minum secara *ad libitum*. Hewan coba yang digunakan harus sehat sehingga kondisi fisik hewan coba meliputi berat badan ada atau tidaknya kerontokan rambut, kejernihan mata, ada atau tidaknya lendir pada hidung, ada atau tidaknya diare, dan aktivitas motoriknya harus selalu diamati pada **Lampiran 8**. (Yulia dkk., 2015).

4.5.2 Ekstrak Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.lam*)

Sampel berupa daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) dicuci bersih, sampel yang telah dicuci bersih selanjutnya daun dikeringkan dan dihaluskan menggunakan blender. Serbuk daun ubi jalar ungu selanjutnya diekstraksi dengan etanol 70% secara maserasi dengan perbandingan 0,1 gram serbuk daun dalam 100 mL etanol 70% selama 1 jam selanjutnya disaring menggunakan *buchner*. Proses maserasi dilakukan hingga filtrat menjadi jernih. Filtrat selanjutnya diuapkan menggunakan pelarut alkohol 40⁰ C dengan *rotary evaporator* pada **Lampiran 9**. (Dipahayu *et al.*, 2014)

4.5.3 Pemberian Indometasin

Indometasin yang diberikan adalah Indometasin dalam bentuk serbuk berwarna putih yang dilarutkan dalam *natirum karbonat* dan diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde lambung. Indometasin diberikan sebanyak 15 mg/kg BB pada kelompok 2 (kontrol positif), kelompok 3, kelompok 4 dan kelompok 5 selama 1 hari. Berdasarkan penelitian sebelumnya pemberian Indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB selama 1 hari dapat menyebabkan *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) pada **Lampiran 8.** (Aulanni'am *et al*, 2012).

Berat rata-rata tikus yang digunakan adalah ± 160 gram, maka Indometasin yang diperlukan untuk setiap tikus 2,4 mg/tikus. Indometasin yang dibutuhkan :

$$0,16 \text{ kg} \times 15 \text{ mg/kg BB} = 2,4 \text{ mg/tikus}$$

4.5.4 Pengambilan Organ Kolon

Pengambilan organ kolon tikus dilakukan pada hari ke-8. Tikus terlebih dahulu dilakukan dieutanasi dengan cara dislokasi leher. Kemudian tikus tersebut diletakkan dengan posisi rebah dorsal pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan dengan membuat sayatan pada bagian abdomen. Setelah membuat sayatan pada bagian abdomen kemudian organ kolon dipotong dan diisolasi. Kolon selanjutnya dibilas dengan NaCl fisiologi 0,9% dan dimasukkan dalam *Neutral Buffered Formaline* sebagai larutan fiksasi untuk pembuatan preparat histologi. Proses fiksasi merupakan usaha mematikan dan mengawetkan jaringan dengan mempertahankan bentuk dan struktur alaminya pada **Lampiran 10.**

4.6 Histopatologi Kolon

4.6.1 Pembuatan Preparat Histologi Kolon

Prosedur yang dilakukan antara lain sebagai berikut:

1. Fiksasi merupakan teknik pembilasan kolon menggunakan NaCl-fisologis 0,9%. Organ kolon selanjutnya dibagi dan dimasukkan dalam larutan *Neutral Buffered Formaline*
2. Dehidrasi merupakan proses pengeluaran air dari jaringan agar jaringan dapat diiris tipis dan diisi parafin. Langkah yang dilakukan adalah kolon dimasukan dalam larutan alkohol secara bertingkat (konsentrasi alkohol mulai dari 70%, 80%, 90%, 85%, sampai 100%) masing-masing selama 2 jam.
3. *Clearing* merupakan proses yang dilakukan untuk membuat kolon jernih dan transparan. Kolon dimasukkan dalam *xylol I* selama 1 jam, *xylol II* selama 30 menit, dan *xylol III* selama 30 menit.
4. *Embedding* merupakan proses memasukkan jaringan kolon kedalam cairan parafin. Dimasukkan jaringan kolon ke dalam paraffin dan ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60°C.
5. *Sectioning* merupakan proses pemotongan atau pengirisan jaringan kolon dengan *mikrotome*. Jaringan kolon dalam blok parafin dipotong dengan ketebalan 4-6 μm . Agar tembus cahaya saat dilakukan pemeriksaan dengan mikroskop. Kemudian kolon di rendam dalam water bath suhu 40°C untuk menghilangkan kerusakan halus pada preparat. Preparat dikeringkan pada suhu kamar (26-27°C).

6. *Mounthing* merupakan proses penempelan jaringan object glass. Jaringan kolon ditempelkan pada objek glass dan dikeringkan diatas hit plate suhu 38-40°C sampai kering, kemudian di simpan pada inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Tahap selanjutnya adalah tahap pewarnaan menggunakan hematoxilin eosin

4.6.2 Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Pewarnaan preparat dengan *Hematoxylin Eosin* (HE) untuk mewarnai jaringan. Zat warna hematoxilin untuk memberi warna biru pada inti sel dan eosin untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma sel. Berikut tahap pearnan yang dilakukan:

- a. Deparafinisasi merupakan proses yang digunakan untuk menghilangkan dan melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Preparat dimasukkan dalam xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit.
- b. Rehidrasi merupakan proses yang digunakan untuk memasukkan air kedalam jaringan. Air akan mengisi rongga-rongga jaringan yang kosong. Preparat dimasukkan dalam alkohol 100%, 90%, 80%, masing-masing selama 5 menit kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1 menit.
- c. Pewarnaan I merupakan proses yang digunakan untuk memberi warna biru pada inti dan sitoplasma jaringan. Preparat dimasukkan dalam *hematoxylin* selama 5 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1 menit.
- d. Defferensiasi merupakan teknik yang dilakukan untuk mengurangi warna biru yang pekat pada inti sel dan menghilangkan warna biru pada sitoplasma.

Preparat dimasukkan dalam *hydrolic acid* (HCl) 0,6% selama 1 menit.

Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1 menit.

- e. Blueing merupakan teknik yang dilakukan untuk memperjelas warna biru pada inti sel. Preparat dimasukkan dalam *lithium carbonat* 0,5% selama 3 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1 menit.
- f. Pewarnaan II merupakan proses yang digunakan untuk memberi warna merah muda pada sitoplasma. Preparat dimasukkan dalam eosin selama 3 menit.
- g. Dehidrasi merupakan proses yang digunakan untuk menghilangkan air dari jaringan, preparat dimasukkan dalam alkohol 80%, 90%, 100% masing-masing 5 menit.
- h. Clearing merupakan proses yang digunakan untuk membuat jaringan menjadi jernih dan transparan. Preparat dimasukkan dalam *xylol* I dan II selama 1 menit.
- i. Mounthing merupakan proses yang digunakan untuk mengawetkan jaringan yang telah diwarnai. Preparat diberi *entellan/canada balsam* dan ditutup dengan *cover glass*

4.6.3 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi kolon dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 400x. Pengambilan gambar histopatologi kolon menggunakan kamera digital. Pengamatan histopatologi kolon berupa pengamatan kualitatif berdasarkan gambaran histopatologi yang terlihat.

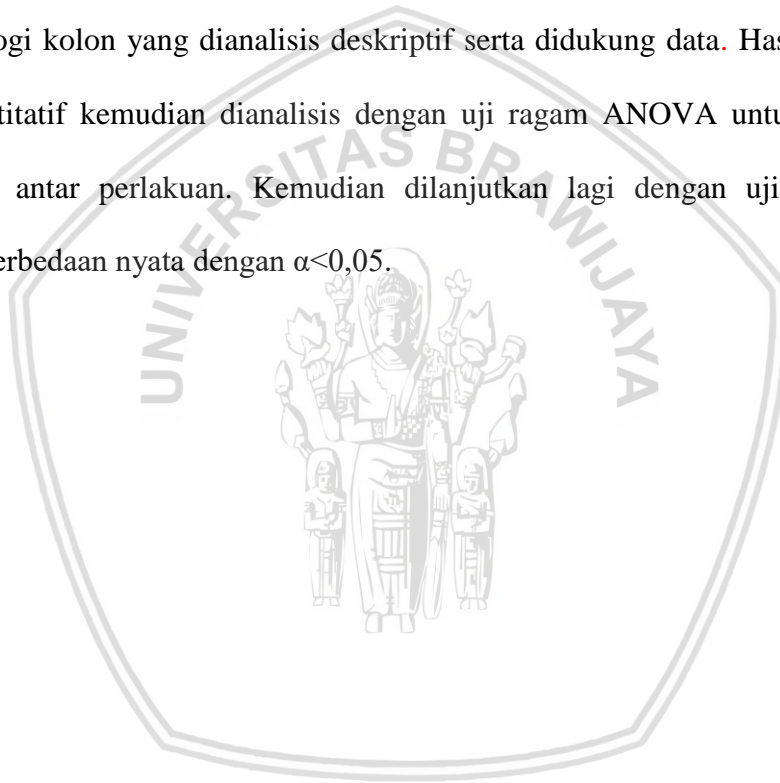
4.7 Penentuan Ekspresi TNF- α dengan Teknik Imunohistokimia

Langkah-langkah yang dilakukan dalam penentuan ekspresi TNF- α dengan teknik imunohistokimia adalah dengan merendam preparat kolon dalam xylol sebanyak 2 kali menggunakan alkohol bertingkat (96%,90%,80%,70%). Preparat selanjutnya dicuci dalam PBS (*Phosphat Buffer Saline*) dengan pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat kemudian direndam dalam 3% hidrogen peroksida selama 20 menit. Langkah selanjutnya preparat dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 kali masing-masing selama 5 menit. Setelah dilakukan pencucian, preparat kemudian direndam dalam 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) selama 10-30 menit pada suhu ruang. Setelah dilakukan perendaman, preparat kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit dan selanjutnya ditambahkan antibodi primer selama 1 jam pada suhu ruang serta diinkubasi selama semalam. Langkah selanjutnya yang dilakukan adalah preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali masing-masing 5 menit dan kemudian ditambah dengan antibodi sekunder berlabel SA-HRP (*Strep Avidin Horseradish Peroxidase*) selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah dilakukan penambahan antibodi sekunder langkah selanjutnya yaitu dicuci dalam PBS pH 7,4 sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Preparat kemudian ditambahkan dengan kromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochlorine*) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Preparat kemudian dicuci dengan aquades sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Preparat selanjutnya dilakukan *counterstain* dengan hematoksilin selama 5 menit pada suhu ruang dan dicuci dengan aquades 3x5 menit.

Tahap terakhir yaitu dilakukan *mounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan cover glass selanjutnya diamati dengan mikroskop cahaya (*Olympus BX15*) dengan perbesaran 400x (Aisha dkk, 2010).

4.8 Analisis Data

Data penelitian ini berupa data kualitatif. Data kualitatif berupa gambaran histopatologi kolon yang dianalisis deskriptif serta didukung data. Hasil pengukuran data kualitatif kemudian dianalisis dengan uji ragam ANOVA untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Kemudian dilanjutkan lagi dengan uji BNJ apabila terdapat perbedaan nyata dengan $\alpha < 0,05$.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Gambaran Histopatologi Kolon pada Tikus Model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi Indometasin

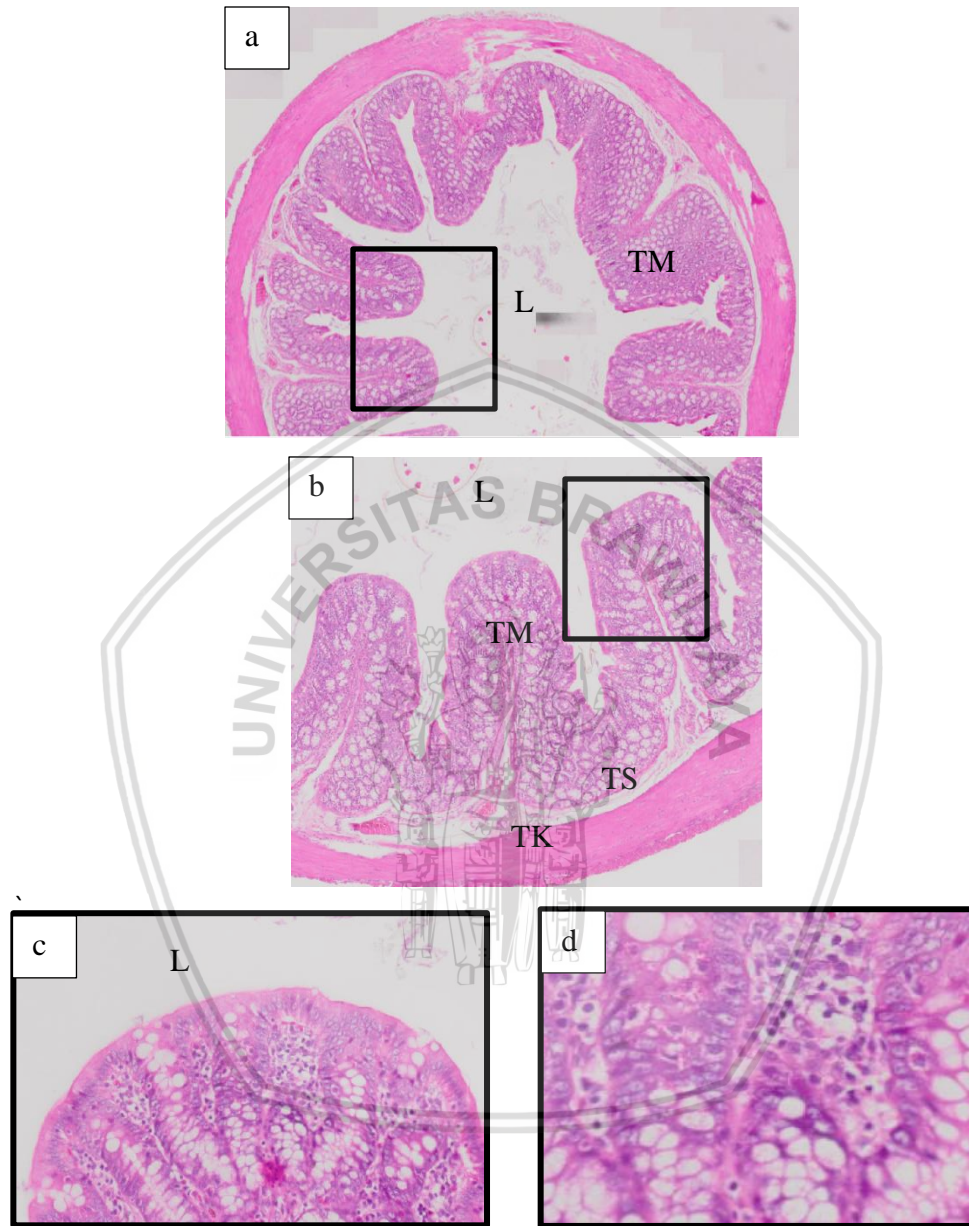
Disease yang diinduksi Indometasin

Organ kolon adalah salah satu bagian dari saluran pencernaan yang terdiri dari empat lapisan yaitu tunika mukosa, submukosa, muskularis eksterna dan serosa. Tunika mukosa terdiri dari lapisan epitel selapis silindris, lamina propria, kriptas yang bersusun rapi, dan paralel serta sel goblet lebih banyak dibandingkan usus halus. Tunika submukosa terdiri dari jaringan ikat, pembuluh darah, dan saraf. Tunika muskularis eksterna terdiri dari lapisan otot polos, sedangkan tunika serosa terdiri dari sel adiposa. Kolon tidak membentuk vili seperti usus halus namun memiliki bentukan yang disebut dengan kriptas (Eroschenco, 2008). Gambaran histopatologi kolon tikus model *Inflammatory Bowel Disease* yang diinduksi Indometasin dan diterapi menggunakan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) dapat diamati menggunakan teknik pewarnaan *Hematoxilin-Eosin* (HE) dengan mengamati pada bagian mukosa. Pada bagian mukosa terdapat adanya kerusakan kolon yaitu berupa adanya infiltrasi sel radang dan erosi pada bagian epitel seperti yang dapat dilihat pada (**Gambar 5.1**).

Hasil pengamatan terhadap gambaran histopatologi kolon menunjukkan adanya perbedaan pada tiap kelompok perlakuan. Pada kelompok tikus kontrol negatif yang menunjukkan gambaran histologi normal kolon. Gambaran histologi normal kolon yang ditunjukkan adalah tunika mukosa yang menunjukkan struktur epitel yang sejajar dan tidak adanya sel radang dibandingkan dengan kelompok terapi

maupun kontrol positif (**Gambar 5.1.A**). Pada kelompok tikus kontrol positif gambaran histopatologi kolon menunjukkan adanya kerusakan pada bagian tunika mukosa. Kerusakan yang terdapat pada tunika mukosa adalah adanya erosi bagian epitel. Selain adanya erosi pada bagian epitel, terdapat adanya infiltrasi sel radang (**Gambar 5.1.B**).

Pada kelompok perlakuan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu terdapat tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok perlakuan A, kelompok perlakuan B dan kelompok perlakuan C. Pada tikus kelompok perlakuan A yang merupakan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dosis 600 mg/kg BB, menunjukkan adanya kerusakan bagian epitel kolon dan infiltrasi sel radang pada jaringan kolon (**Gambar 5.1.C**). Pada tikus kelompok perlakuan B yang merupakan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 700 mg/kg BB menunjukkan masih terlihat adanya infiltrasi sel radang dan erosi pada bagian epitel namun terdapat perbaikan dibandingkan terapi dengan dosis 600 mg/kg BB (**Gambar 5.1.D**). Pada tikus kelompok perlakuan C yang merupakan kelompok terapi ekstrak etanol daun ubi dengan dosis 800 mg/kg BB menunjukkan adanya perbaikan yang optimal dimana epitel pada mukosa kolon terlihat sejajar walaupun masih terdapat sedikit kerusakan namun mengalami penurunan yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok perlakuan C yang menggunakan dosis 700 mg/kg BB. Selain itu adanya penurunan infiltrasi sel radang dibandingkan dengan kelompok perlakuan A dan kelompok perlakuan B (**Gambar 5.1.E**).



Keterangan :

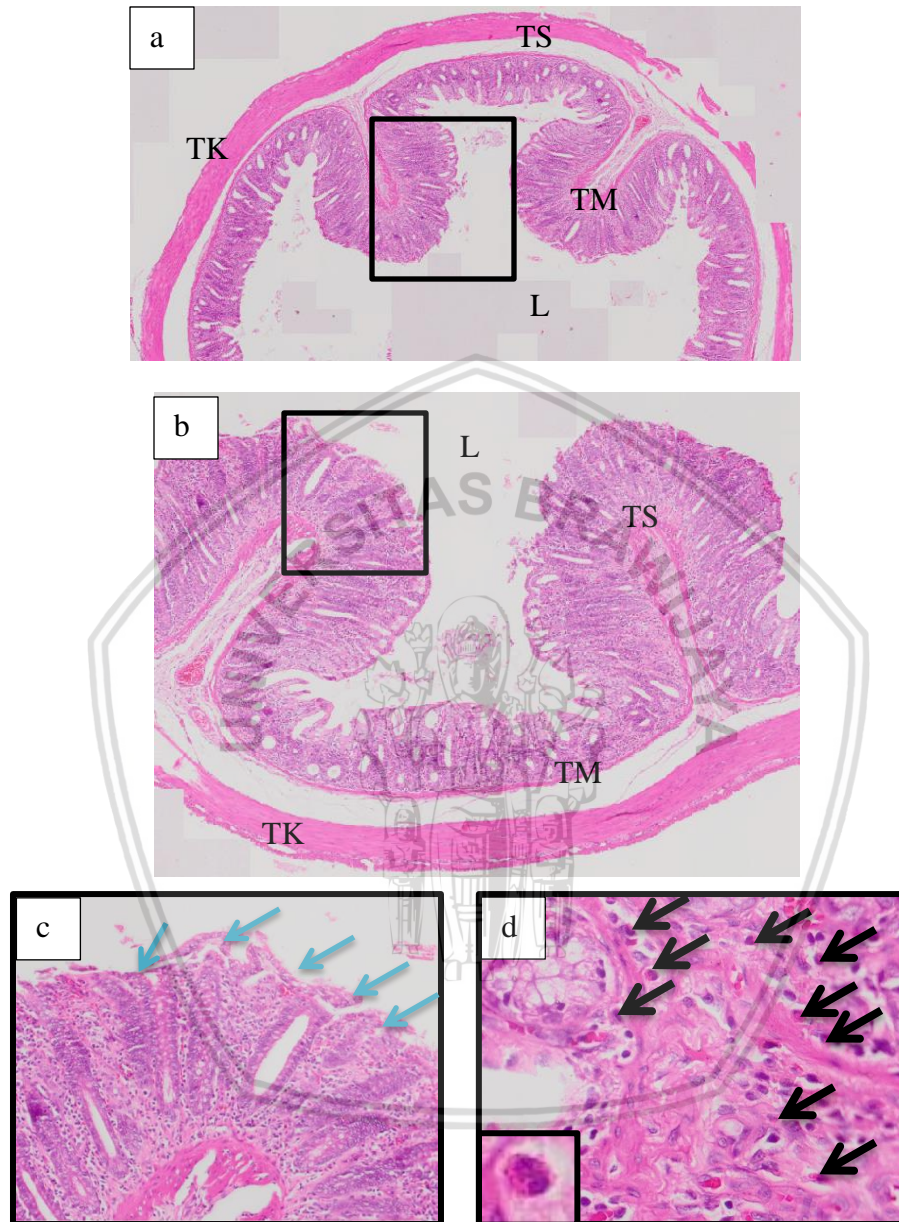
TM : Tunika mukosa

TS : Tunika submukosa

TK : Tunika muskularis

L : Lumen

Gambar 5.1.A Gambaran histologi kolon tikus putih kontrol negatif dengan pewarnaan HE, perbesaran 40x (a), perbesaran 400x (b), bagian epitel kolon yang sejajar (c), lapisan mukosa yang tidak adanya kerusakan (d).



Keterangan :

TM : Tunika mukosa

TS : Tunika submukosa

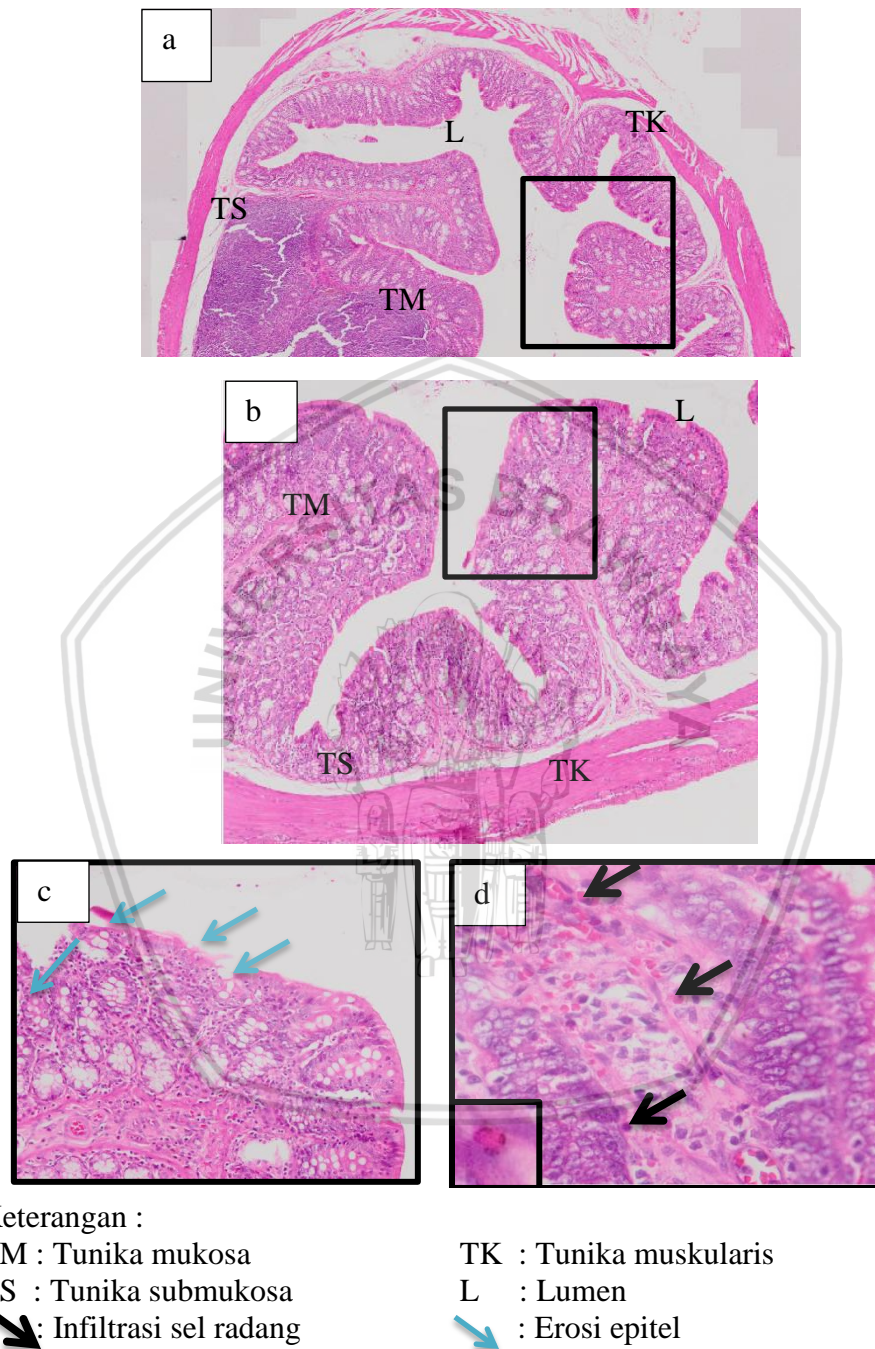
↘ : Infiltrasi sel radang

TK : Tunika muskularis

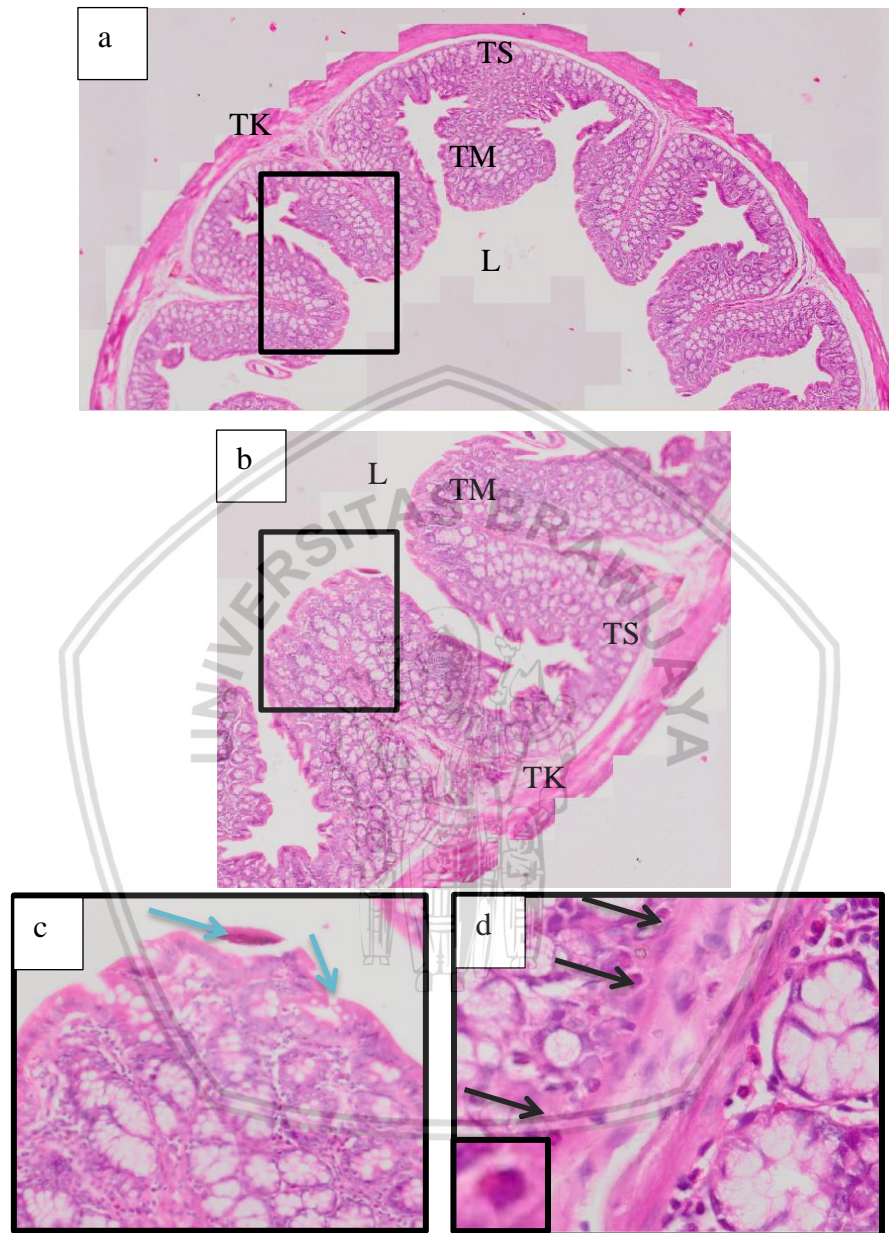
L : Lumen

↗ : Erosi epitel

Gambar 5.1.B Gambaran histologi kolon tikus putih kontrol positif dengan pewarnaan HE, perbesaran 40x (a), perbesaran 400x (b), tampak adanya erosi pada epitel (c) dan adanya infiltrasi sel radang (d).



Gambar 5.1.C Gambaran histologi kolon tikus putih perlakuan A dengan pewarnaan HE, perbesaran 40x (a), perbesaran 400x (b), tampak adanya perbaikan sehingga nampak sedikit erosi pada epitel (c) dan adanya infiltrasi sel radang yang berkurang (d).



Keterangan :

TM : Tunika mukosa

TS : Tunika submukosa

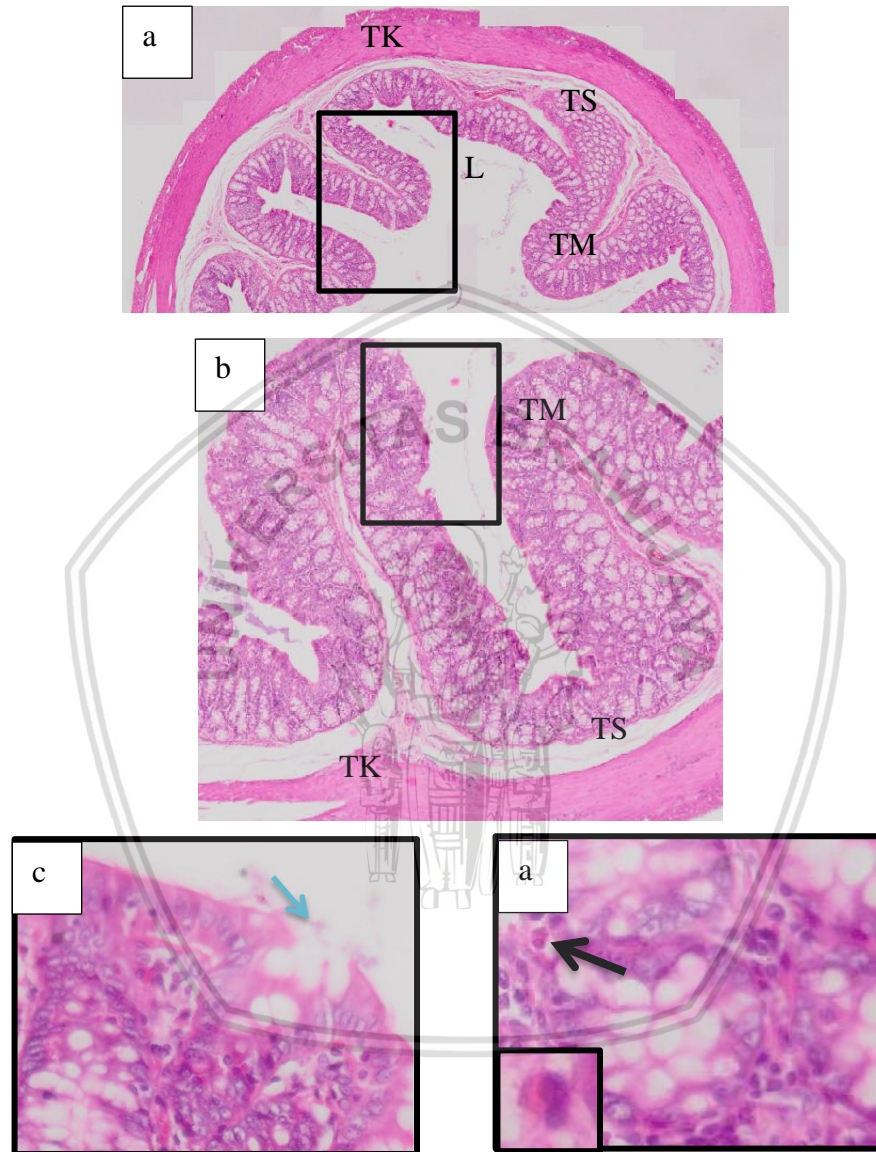
↘ : Infiltrasi sel radang

TK : Tunika muskularis

L : Lumen

↘ : Erosi epitel

Gambar 5.1.D Gambaran histologi kolon tikus putih perlakuan B dengan pewarnaan HE, perbesaran 40x (a), perbesaran 400x (b), adanya perbaikan pada erosi epitel dibandingkan perlakuan A (c) dan adanya sedikit infiltrasi sel radang dibandingkan perlakuan A (d).



Keterangan :

TM : Tunika mukosa

TS : Tunika submukosa

↘ : Infiltrasi sel radang

TK : Tunika muskularis

L : Lumen

↘ : Erosi epitel

Gambar 5.1.E Gambaran histologi kolon tikus putih perlakuan C dengan pewarnaan HE, perbesaran 40x (a), perbesaran 400x (b), adanya perbaikan epitel dibandingkan perlakuan B (c) dan adanya infiltrasi sel radang yang berkurang dibandingkan perlakuan C (d).

Pada tikus kelompok kontrol negatif menunjukkan tidak adanya kerusakan epitel berupa erosi epitel maupun infiltrasi sel radang (**Gambar 5.1.A**) dibandingkan dengan tikus kelompok kontrol positif yang menunjukkan adanya erosi pada bagian epitel dan infiltrasi sel radang (**Gambar 5.1.B**). Hal ini dikarenakan kelompok kontrol negatif merupakan kelompok yang tidak diberi induksi Indometasin sehingga dijadikan sebagai indikator histologi normal kolon. Pada kelompok tikus kontrol positif menunjukkan adanya kerusakan dikarenakan pemberian Indometasin 15 mg/kg BB dianggap sebagai antigen yang menyebabkan teraktivasinya makrofag. Aktivasi tersebut akan menyebabkan fagositosis dari antigen yang masuk ke jaringan khususnya Indometasin. Proses fagositosis tersebut akan mengakibatkan produksi radikal bebas. Peningkatan produksi radikal bebas keadaan stress oksidatif. Stress oksidatif adalah suatu keadaan terjadinya oksidasi yang berlebih di dalam jaringan. Keadaan stress oksidatif akan menyebabkan peroksidasi lipid yang mengakibatkan terjadinya kerusakan pada jaringan kolon (Zhang *et al.*, 2001).

Gambaran histopatologi pada tiga kelompok perlakuan yaitu kelompok perlakuan A, B dan C menunjukkan hasil yang berbeda (**Gambar 5.1.C, D, E**). Tingkat perbaikan jaringan mukosa kolon pada kelompok perlakuan C dengan dosis 800 mg/kg BB lebih baik dibandingkan dengan kelompok perlakuan B dengan dosis 700 mg/kg BB dan kelompok perlakuan A dengan dosis 600 mg/kg BB. Hal ini ditandai dengan epitel yang teratur namun masih terdapat adanya infiltrasi sel radang. Dosis yang baik untuk terapi yang digunakan menurut Riansyah (2015) adalah 600 mg/kg BB. Sehingga dengan peningkatan dosis terapi dapat meningkatkan

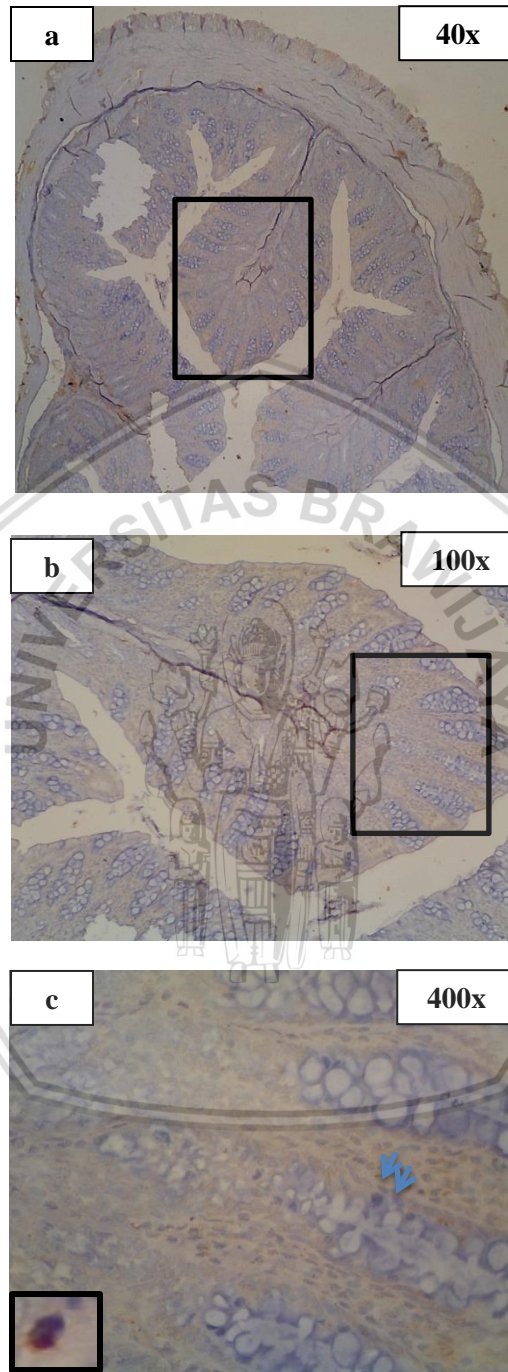
kemampuan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang mengandung antosianin sebagai antioksidan.

Perbaikan yang terjadi pada mukosa kolon terjadi karena aktivitas antosianin sebagai antioksidan. Mekanisme kerja antosianin pada *Inflammatory Bowel Disease* yaitu dengan berperan sebagai ROS *scavenging*. Peran antosianin sebagai ROS *scavenging* dengan mendonorkan satu ion hidrogen (H^+) pada senyawa ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang mengakibatkan menjadi senyawa yang stabil dan mengurangi pembentukan senyawa oksidatif yang berlebih. Keadaan ini akan menyebabkan penurunan stress oksidatif di dalam jaringan (Sayuti dan Yenrina, 2015).. Penurunan keadaan stress oksidatif di dalam jaringan akan menyebabkan tidak terjadinya peroksidasi lipid sehingga mampu tidak terjadi kerusakan jaringan di organ kolon (Sodagari *et al.*, 2015).

5.2 Ekspresi *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) Kolon pada Tikus Model *Inflammatory Bowel Disease*

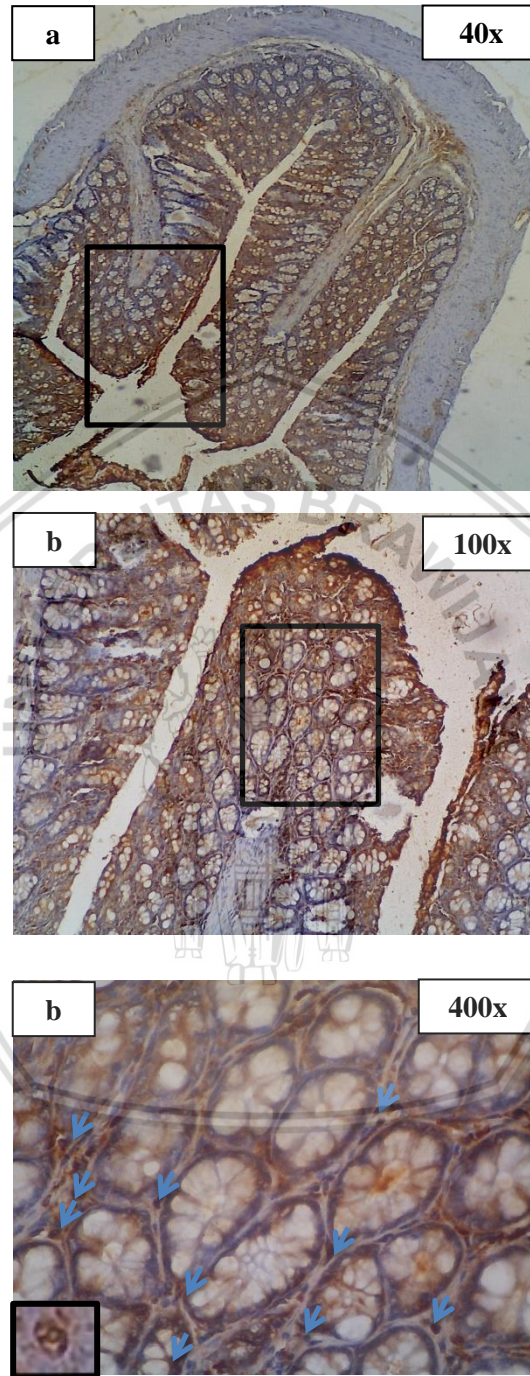
Hasil ekspresi TNF- α pada kolon tikus putih (*Rattus novergicus*) ditunjukkan adanya intensitas warna cokelat. Intesitas warna cokelat disebabkan adanya ikatan spesifik antara antigen dan antibodi. Ikatan spesifik antara antigen dan antibodi menandai terdapatnya sitokin proinflamasi yaitu TNF- α . Hasil ekspresi TNF- α pada masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan yang ditandai dengan perbedaan persentase warna cokelat.

Kelompok tikus kontrol negatif merupakan kelompok tikus yang tidak diberi perlakuan. Pada kelompok tikus kontrol negatif, ekspresi TNF- α yang sedikit terekspresi pada bagian kolon yaitu pada sel epitel (**Gambar 5.2.A**). Kelompok tikus kontrol positif merupakan kelompok tikus yang diberi perlakuan berupa induksi Indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB, Pada tikus kelompok kontrol positif, ekspresi TNF- α menunjukkan peningkatan di dalam jaringan (**Gambar 5.2.B**). Pada tikus kelompok perlakuan A yang merupakan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dosis 600 mg/kg BB, menunjukkan adanya penurunan ekspresi TNF- α pada jaringan kolon (**Gambar 5.2.C**). Pada tikus kelompok perlakuan B yang merupakan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 700 mg/kg BB menunjukkan adanya penurunan ekspresi TNF- α dibandingkan kelompok perlakuan A (**Gambar 5.2.D**) sedangkan pada tikus kelompok perlakuan C yang merupakan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 800 mg/kg BB terdapat penurunan ekspresi TNF- α yang paling rendah (**Gambar 5.2.E**).



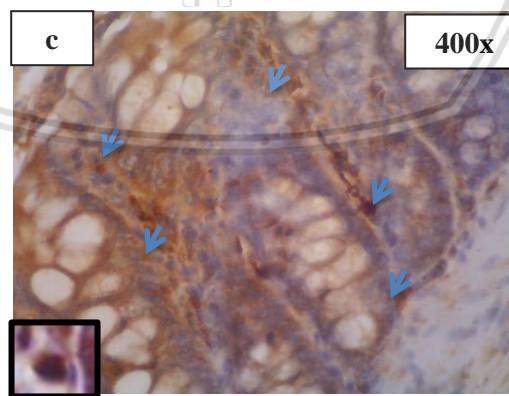
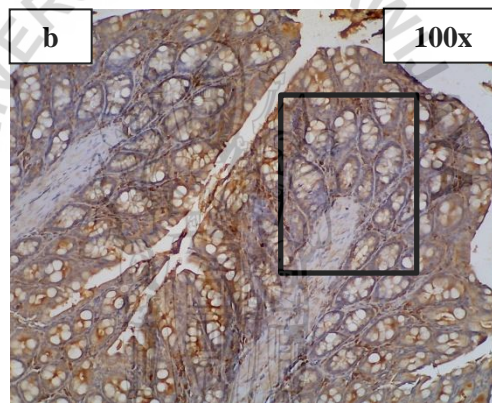
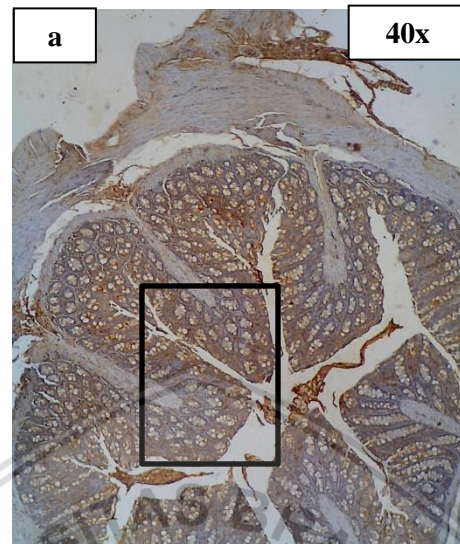
Gambar 5.2.A Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* α pada kolon Kontrol Negatif

Keterangan: Gambaran ekspresi TNF α kolon tikus putih kontrol negatif dengan pewarnaan IHC, perbesaran 40x (a), 100x (b) dan 400x (c).Tanda panah (\rightarrow) menunjukkan adanya ekspresi TNF α (Perbesaran 400x)



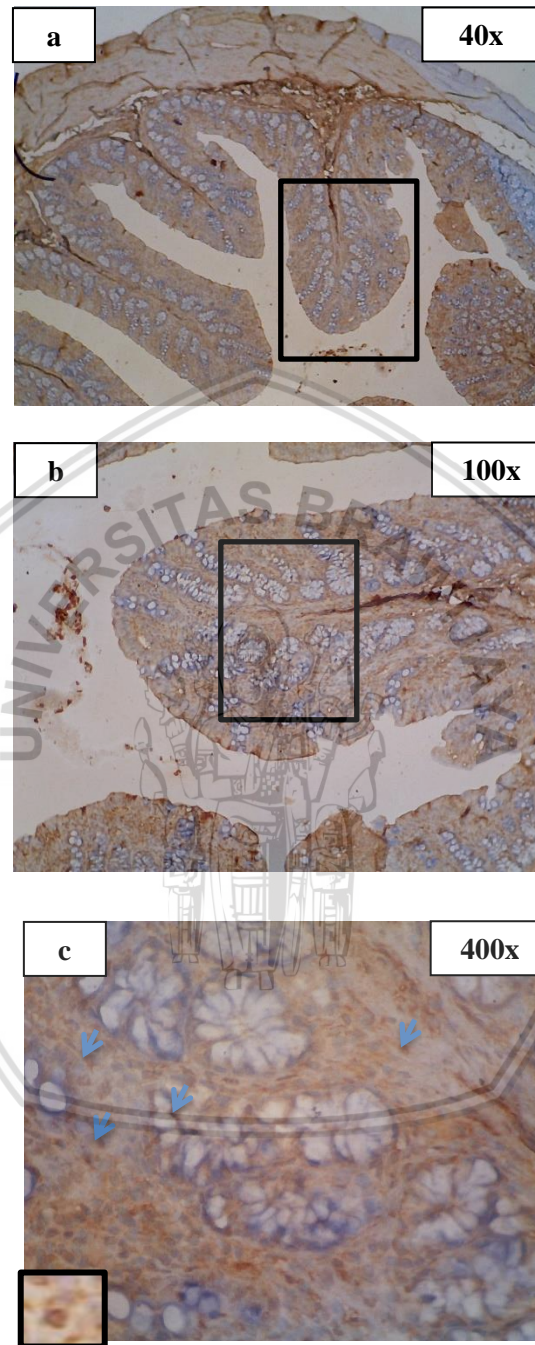
Gambar 5.2.B Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* – α pada kolon Kontrol Positif

Keterangan: Gambaran ekspresi TNF – α kolon tikus putih kontrol positif dengan pewarnaan IHK, perbesaran 40x (a), 100x (b) dan 400x (c).Tanda panah (→) menunjukkan adanya ekspresi TNF – α (Perbesaran 400x)



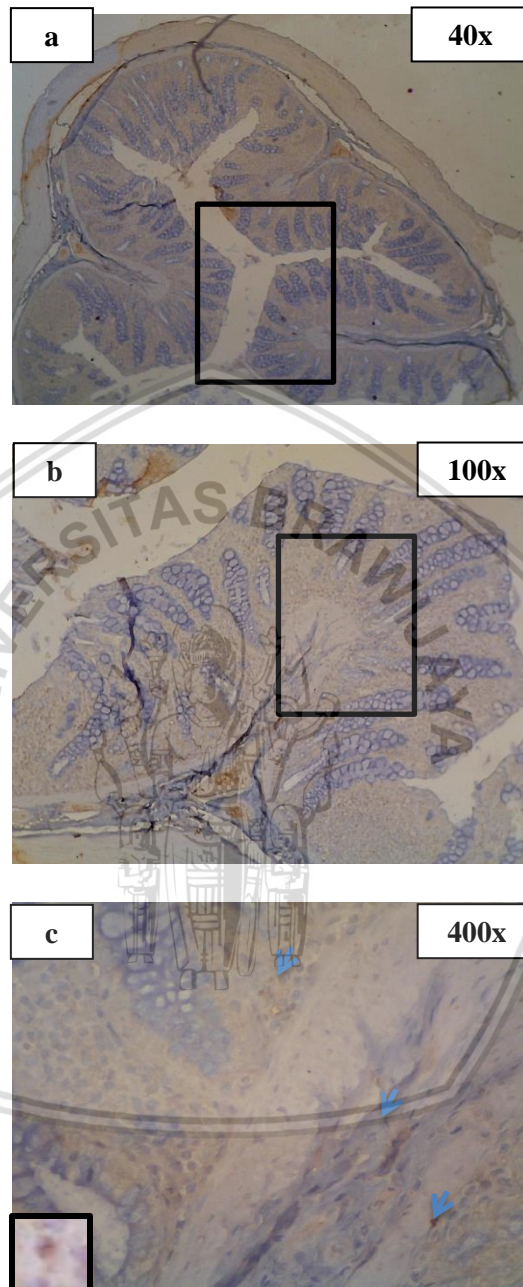
Gambar 5.2.C Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* - α pada kolon Perlakuan A

Keterangan: Gambaran ekspresi TNF - α kolon tikus putih perlakuan A dengan pewarnaan IHC, perbesaran 40x (a), 100x (b) dan 400x (c).Tanda panah (→) menunjukkan adanya ekspresi TNF - α (Perbesaran 400x)



Gambar 5.2.D Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* – α pada kolon Perlakuan B

Keterangan: Gambaran ekspresi TNF – α kolon tikus putih perlakuan B dengan pewarnaan IHK, perbesaran 40x (a), 100x (b) dan 400x (c).Tanda panah (→) menunjukkan adanya ekspresi TNF – α (Perbesaran 400x)



Gambar 5.2.E Ekspresi *Tumor Necrosis Factor* – α pada kolon Perlakuan C

Keterangan: Gambaran ekspresi TNF – α kolon tikus putih perlakuan C dengan pewarnaan IHK, perbesaran 40x (a), 100x (b) dan 400x (c).Tanda panah (→) menunjukkan adanya ekspresi TNF – α (Perbesaran 400x)

Ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.2.A**) menunjukkan ekspresi yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2.B**) dan kelompok perlakuan. Hal ini terjadi karena kelompok kontrol negatif dalam keadaan normal dan tidak mengalami kerusakan jaringan. Sedangkan pada jaringan yang rusak TNF- α akan meningkat jumlahnya dan akan semakin menurun jika sudah melewati fase inflamasi. Pada kelompok kontrol negatif, ekspresi TNF- α yang sedikit terekspresi pada bagian kolon yaitu pada sel epitel (**Gambar 5.2.A**). Hal tersebut menunjukkan bahwa keadaan normal sitokin di dalam tubuh akan tetap ada walaupun dalam jumlah yang sedikit. Menurut Patil et al., (2011) TNF- α merupakan sitokin multifungsi yang dapat memediasi inflamasi, respon imun dan apoptosis. TNF- α juga memiliki peran penting dalam homeostasis beberapa organ. Oleh karena itu TNF- α akan tetap terekspresi dalam keadaan normal.

Kelompok kontrol positif digunakan sebagai indikator ekspresi TNF- α model *Inflammatory Bowel Disease* tanpa pemberian terapi. Ekspresi kelompok kontrol positif (**Gambar 5.2.B**) meningkat dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (**Gambar 5.2.A**). Hal ini dikarenakan adanya *Inflammatory Bowel Disease* akibat induksi Indometasin yang menyebabkan adanya inflamasi pada jaringan kolon sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan kolon. Kerusakan jaringan kolon menyebabkan aktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi selanjutnya akan mengekspresikan protein *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas I pada permukaan sel dan berikatan dengan reseptor sel T (Tr) dari sel T *helper* (Th). Makrofag yang teraktivasi tersebut selanjutnya akan menginduksi makrofag untuk

mensekresikan sitokin pro inflamasi salah satunya TNF- α . Sitokin TNF- α selanjutnya akan diaktivasi oleh TNF reseptor (TNFR) pada bagian sitoplasma untuk menghasilkan reaksi inflamasi (Patil *et al.*, 2011).

Kelompok perlakuan digunakan sebagai pembanding *model Inflammatory Bowel Disease* yang diterapi menggunakan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis yang berbeda. Pada kelompok perlakuan, ekspresi TNF- α mengalami penurunan pada kelompok perlakuan A, B dan C (**Gambar 5.2.C, D, E**). Penurunan ekspresi TNF- α disebabkan karena proses inflamasi yang berkurang. Pemberian ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang berfungsi sebagai antiinflamasi ini bekerja dengan cara menghambat aktivasi NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa- β*). Penghambatan aktivasi NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa- β*) akan menghambat aktivasi makrofag untuk mengeluarkan sitokin pro inflamasi seperti TNF- α . Jika inflamasi tidak berjalan secara berlebih maka akan mempercepat memasuki proses regenerasi akan berjalan dengan cepat (Zhang *et al.*, 2001).

Pada uji kuantitatif, tikus kelompok kontrol negatif memiliki rata-rata ekspresi TNF- α sebanyak $0,0415 \pm 0,00661$. Pada kelompok tikus kontrol positif memiliki nilai persentase peningkatan ekspresi TNF- α jaringan kolon pada tikus yang diinduksi Indometasin yaitu sebesar 95,16 %. Pada pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan kelompok perlakuan A dengan dosis 600 mg/kg BB, kelompok perlakuan B dengan 700 mg/kg BB dan kelompok perlakuan C dengan dosis 800 mg/kg BB mampu menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α sebesar 28,77%, 50,14 % dan 72,16 % (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.1 Ekspresi TNF- α kolon tikus putih (*Rattus novergicus*) ($p < 0,05$)

Kelompok	Persentase Area TNF- α	Ekspresi TNF- α (%)	
		Peningkatan	Penurunan
Kelompok negatif	$0,0415 \pm 0,00661^a$	-	-
Kelompok positif	$0,8585 \pm 0,01907^c$	95,16 %	-
Perlakuan A	$0,6115 \pm 0,01578^d$	-	28,77 %
Perlakuan B	$0,4280 \pm 0,02197^c$	-	50,14 %
Perlakuan C	$0,2390 \pm 0,01763^b$	-	72,16 %

Keterangan : Perbedaan notasi a, b, c, d dan e menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok perlakuan.

Pada kelompok kontrol negatif menunjukkan perbedaan nyata dengan kelompok kontrol positif. Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok yang tidak diberi perlakuan sehingga tidak terjadi kerusakan pada jaringan kolon. Kelompok kontrol positif menunjukkan perbedaan signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dengan rata-rata $0,8585 \pm 0,01907$. Kontrol positif digunakan sebagai pembanding dengan kelompok terapi dimana kontrol positif adalah indikator secara normal tanpa diberi terapi.

Ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan yang diberikan terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 600 mg/kg BB, 700 mg/kg BB dan 800 mg/kg BB menunjukkan hasil yang berbeda yaitu adanya penurunan ekspresi TNF- α jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Pada kelompok perlakuan terapi dengan dosis 600 mg/kg BB menunjukkan penurunan ekspresi TNF- α jika

dibandingkan dengan kelompok kontrol positif namun masih menunjukkan hasil yang tidak signifikan. Pada kelompok terapi dengan dosis 800 mg/kg BB sudah menunjukkan penurunan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan terapi dengan dosis 600 mg/kg BB dan 700 mg/kg BB. Pada kelompok perlakuan terapi dosis 800 mg/kg BB sudah menunjukkan penurunan yang signifikan terhadap kontrol positif dan sudah mendekati ekspresi TNF- α pada kontrol negatif. Hal ini dikarenakan adanya peningkatan dosis terapi perlakuan. Menurut Riansyah (2015) bahwa kandungan antosianin dalam ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan dosis 600 mg/kg BB efektif sebagai antiinflamasi. Sehingga dengan adanya peningkatan dosis mampu meningkatkan efektifitas sebagai antiinflamasi.

Penurunan kerusakan pada jaringan kolon akibat *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dikarenakan pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang mengandung senyawa aktif antosianin. Senyawa antosianin merupakan senyawa yang bekerja sebagai antiinflamasi dengan menghambat aktivasi NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*). Penghambatan aktivasi NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*) akan menyebabkan tidak terbentuknya IKK (I- κ B kinase) yang berfungsi untuk mendegradasi I- κ B. I- κ B berfungsi untuk mengikat NF- κ B sehingga NF- κ B dalam keadaan tidak aktif dan tetap berada di dalam nukleus. Terhambatnya aktivasi NF- κ B akan menyebabkan tidak terbentuknya sitokin-sitokin pro inflamasi yaitu TNF- α sehingga akan menurunkan inflamasi yang terjadi pada jaringan kolon (Miguel, 2011).

Indometasin yang masuk ke dalam tubuh dalam kolon akan mengakibatkan penghambatan terhadap enzim COX-1 dan COX-2 sehingga menyebabkan terhambatnya produksi Prostaglandin H_2 (PGH_2). Penghambatan enzim COX-1 akan menyebabkan terhambatnya produksi TXA_2 , PGI_2 , serta PGE_2 yang menyebabkan peningkatan asam lambung, penurunan sekresi mukus yang menyebabkan perlindungan mukosa hilang (Suleyman *et al.*, 2007). Penghambatan terhadap enzim COX-2 akan menyebabkan terhambatnya produksi PGI_2 dan PGE_2 yang mengakibatkan vasokonstriksi dan tidak terjadinya penghambatan agregasi trombosit (Justice dan Carruthers, 2005).

Penghambatan kedua enzim tersebut akan menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan mikroflora sehingga interaksi antara mukosa dan mikroflora sebagai antigen. Antigen selanjutnya dikenali oleh *Toll-Like Reseptor* (TLRs) di permukaan enterosit. *Toll-Like Reseptor* (TLRs) selanjutnya akan mengaktifkan NF- κ B yang menginduksi makrofag untuk mensekresikan sitokin pro-inflamasi yaitu TNF- α , IL-6, dan IL-12 (Balmus *et al.*, 2016). Semakin banyaknya sitokin pro-inflamasi yang terdapat di daerah inflamasi akan mengakibatkan banyaknya jumlah ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang mampu merusak jaringan kolon (Bratawidjaya, 2010).

Kerusakan jaringan kolon ditunjukkan melalui gambaran histopatologi berupa erosi pada epitel kolon dan infiltrasi sel radang. Adanya kerusakan pada gambaran histopatologi kolon berhubungan dengan ekspresi TNF- α . Peningkatan ekspresi TNF- α pada jaringan kolon akan menyebabkan aktivasi kemotaksis neutrofil sehingga

mengaktivasi molekul adhesi yang menunjukkan reaksi inflamasi. Reaksi inflamasi ditunjukkan dengan adanya kerusakan jaringan berupa erosi epitel dan infiltrasi sel radang pada jaringan kolon (Avramescu *et al.*, 2010).

Penurunan kerusakan pada jaringan kolon dikarenakan pemberian terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang mengandung senyawa antosianin. Senyawa antosianin yang terdapat di dalam daun ubi jalar ungu akan mendonorkan satu atom hidrogen (H^+) pada ROS (*Reactive Oxygen Species*). Hal ini akan mengakibatkan penghentian proses perusakan sel sehingga ROS (*Reactive Oxygen Species*) tidak memiliki kemampuan mengambil atom dari sel (Sayuti dan Yenrina, 2015). Selain itu, antosianin juga berperan sebagai antiinflamasi dengan melakukan penghambatan aktivasi NF- κ B. Penghambatan aktivasi NF- κ B akan menyebabkan tidak terbentuknya fosforilasi I- κ B kinase yang berfungsi untuk mendegradasi I- κ B. Hal ini akan menyebabkan NF- κ B dalam keadaan tidak aktif dan tetap berada di dalam sitoplasma sehingga tidak mampu mengaktivasi makrofag untuk menghasilkan beberapa sitokin pro-inflamasi salah satunya TNF- α untuk respon inflamasi pada jaringan kolon. Sitokin pro-inflamasi TNF- α yang tidak dihasilkan akan menyebabkan tidak adanya respon inflamasi pada jaringan kolon. Hal ini akan menyebabkan adanya penurunan inflamasi pada jaringan kolon. Penurunan inflamasi pada jaringan kolon akan menyebabkan adanya penurunan ekspresi TNF- α dan perbaikan pada gambaran histopatologi kolon yang ditandai dengan penurunan infiltrasi sel radang dan erosi pada epitel kolon (Miguel, 2011).

BAB 6. PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Terapi ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) tikus model *Inflammatory Bowel Disease* mampu menurunkan adanya ekspresi TNF- α pada kolon dimana persentase area pada kelompok negatif $0,0415 \pm 0,00661$, kelompok positif $0,8585 \pm 0,01907$, perlakuan A $0,6115 \pm 0,01578$, perlakuan B $0,4280 \pm 0,02197$, perlakuan C $0,2390 \pm 0,01763$.
2. Terapi ekstrak ekstrak etanol daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas L.lam*) tikus model *Inflammatory Bowel Disease* mampu mengurangi kerusakan pada gambaran histopatologi kolon yaitu berupa berkurangnya erosi pada epitel kolon dan berkurangnya infiltrasi sel radang

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian tersebut mengenai kandungan lain yang secara lengkap yang terdapat pada daun ubi jalar ungu sebagai antioksidan maupun antiinflamasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawiyah, Sukandar,D., Muawanah, A. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Komponen Bioaktif Sari Buah Namnam. *Jurnal Kimia Valensi I(2): 130-136.*
- Aisha, S., Djati,S., Khotimah,H. 2010. Pengaruh Polifenol Teh Hijau Terhadap Prpduksi TNF- α (*Tumor Necrosis Alpha*) Pada Kultur Sel Trofoblas Manusia yang Dipapar Glukosa Tingi 33 mm. Fakultas Kedokteran.
- Antia, B.S., Akpan, E.J., Okon,P.A., Umoren,I.U. 2006. Nutritive and Anti-Nutritive Evaluation of Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas*) Leaves. *Pakistan Journal of Nutrition 5(2) :166-168*
- Aulanni'am, Roosdiana,A., Rahmah, N.L. 2012. The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on *Inflammatory Bowel Disease* Therapy in Rattus novergicus. *Journal of Life Sciences. 144 : 154.*
- Baker, H.J., Lindsey,R.J., Weisbroth,S.H. 1979.*The Laboratory Rat Volume I Biology and Diseases.* Academic Press. New York.
- Baki,M., F.E. Akaman, P. Vural,S. Dogru-Abbasoglu, A.Ozderya, B. Karadag, dan M. Uysal.2012. The Combination of Interleukin-10-1082 and Tumor Necrosis Factor- α 308 or Interleukin -6-174 Genes Polymorphisms Suggest An Association with Susceptibility to Hashimoto's Thyroiditis. *International Immunopharmacology, 12 : 543: 546.*
- Boden, E. 2005. *Black's Veterinary Dictionary.* Ed ke-21. London (UK) :A & C Black Publisher.
- Balmus, I.M., Ciobica,A., Trifan, A., Stanciu,C. 2016. The Implications of Oxidative Stress and Antioxidant Therapies in Inflammatory Bowel Disease: Clinical Aspects and Animal Models. *The Saudi Journal of Gastroenterology.22(1): 3-17.*
- Cerquetalla, M., Spaterna, A., Laus, F., Tesei, B., Rossi, G., Antonelli, E., Villanacci, V., Bassotti, G. 2010. Inflammatory Bowel Disease In The Dog : Diffrences and Similarities with Humans. *World Journal of Gastroenterology.16 (9) :1050-1056.*
- Cornaggia, M., M. Leutner., M. Claudia., GA. Sturniolo., R. Gulloota. 2011. Chronic Idiopathic Inflammatory Bowel Disease : *The Histology Report. Digestive and Liver Disease 43S :S293-S303.*
- Cunningham, J.G, Klein.B.G., Ahmed,S.A., Brinsko,S.P., Davidson, A.P., Greco,D.S., Heidemann,S.R., Herdt,T.H., Robinson, N.E., Schurig,G.G. 2007. *Textbook of Veterinary Physiology.*Ed ke-4. Philadelphia (US) :Saunders Elsevier.

- Dipahayu, D., Soeratri, W., Agil, M. 2014. Formulasi Krim Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* (L.) Lamk) Sebagai Anti Aging. *Volume 1 No. 3* : 166-179.
- Firmansyah, M.A. 2013. *Perkembangan Terkini Diagnosis dan Penatalaksanaan Inflammatory Bowel Disease*. RSUPN Cipto Mangunkusumo. Volume 40. No. 04.
- Frolkis, A., Dieleman, L.A., Barkema, H.W., Panaccione, R., Ghosh, S., Fedorak, R.N., Madsen, K., Kaplan, G.C. 2012. Enviroment and The Inflammatory Bowel Diseases. Pulsus Group
- Geboes, K. 2003. Histopathology of Chron's Disease and Ulcerative Colitis. *ResearchGate* : 255-276.
- George, N.A., Pecota, K.V., Bowen, B.D., Schultheis, J.R., Yencho, G.C. 2011. *Root Pieceplanting in Sweetpotato-a Synthesis of Previous Research and Directions for The Future. Hor Technology 21:703-711.*
- Hall, E. J. 2009. Inflammatory Bowel Disease In Dogs and Cats. *Hill's Pet Nutrition*.
- Higuchi, K., Umegaki, E., Watanabe, T., Yoda, Y., Morita, E., Murano, M., Tokioka, S., Arakawa, T. 2009. Present Status and Strategy of NSAIDs-induced Small Bowel Injury. *Journal Gastroenterol. 44:879-888.*
- Houser, K., Johson and FT. Ishmael. 2012. *Anti-Inflammatory Effects of Methoxyphenolic Compounds on Human Airway Cells*. *Journal of Inflammation 9(6)*.
- Huang, W., Lin, K., Hsu, M., Huang, M., Yang, Z., Chao, P., Yang, C. 2014. Eliminating Interference by Anthocyanin in Chlorophyll Estimation of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Leaves. *Botanical Studies: 55-11.*
- Islam, S. 2003. Nutritional and Medicinal Qualities of Sweetpotato Tops and Leaves. Cooperative Extension Program.
- Justice, E. Dan Carruthers, D.M. 2005. Cardiovascular Risk and COX-2 Inhibitor in Rheumatological Practice. *Nature Publishing Group. 19:1-5.*
- Kathrani, A., Werling, D., Allenspach, K. 2011. Canine Breeds at High Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease in The South-Eastern UK. *Veterinary Record. 169:635.*
- Klein, A. And Eliakim, R. 2010. Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease. *Pharmaceuticals: 1084-1092.*
- Konczak I, Okuno S, Yoshimoto M, Yamakawa O. Caffeoylquinic Acids Generated In Vitro in High Anthocyanin-Accumulating *Sweet potato Cell Line*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2004;5:287- 92.*

- Lacasa, C.L., Villegas, C.A., Lastre, T., Motilva, M.J.M., Calero. 2000. Evidence for Protective and Antioxidant Properties of Rutin, A Natural Flavonoid, Against Ethanol Induced Gastric Lesion. *J Ethanopharmacol.* 71: 45-53.
- Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan, dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta : UI Press, pp : 37-38.
- Miguel, M.G. 2011. Anthocyanins: Antioxidant and or Anti-Inflammatory Activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* (06):07-15.
- Nollet, L.M.L. 1996. *Handbook of Food Analysis: Physical Characterization and Nutrient Analysis*. Marcell Dekker Inc, New York
- Patil, I.H., Patil, L., Kadam, V.J. 2011. Potential Therapeutic Target For Inflammatory Bowel Disease. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research : Vol 4 (1)*.
- Rukmana, R. 1997. *Ubi Jalar Budidaya Pasca Panen*. Yogyakarta : Penerbit Kaninus.
- Samber, L.N., Semangun, H., Prasetyo, B. 2010. Ubi Jalar Ungu Papua Sebagai Sumber Antioksidan. *Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP UNS : 18-188*.
- Sayuti, K. dan Yenrina, R. 2015. *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. Padang : Andalas University Press.
- Setiawan, B., Eko, S. 2005. Stres Oksidatif dan Peran Antioksidan pada Diabetes Melitus. *Vol. 55 :2*.
- Sirois. 2005. *Laboratory Animal Medicine*. Principles and Procedures. USA : Elsevier.
- Sodagari, H.R., Farsaei, M.H., Bahramsoltani, R., Abdolghaffari, A.H., Mahmoudi, M., rezaei, N. 2015. Dietary Anthocyanins as a Complementary Medicinal Approach for Management of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol.* 9(6), 807-820.
- Soeroso, A. 2007. Sitokin. *Jurnal Oftalmologi Indonesia*. Vol.5 No.3 :171-180.
- Solanki, R., Madat, D., Chauhan, K., Parmar, L. 2010. Recent Approaches in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *International Journal of PharmTech Research*. Volume 2 : 1796-1809.
- Solichah, N.A., Aulanni'am. Mahdi, C. 2012. Efek Terapi Ekstrak Air Daun Kedondong (*Lannea coromandelica*) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Protease pada Ileum Tikus Putih (*Rattus novergicus*) *Inflammatory Bowel Disease (IBD)* Akibat Paparan Indometasin. *Veterinaria Medika*. Vol.5. 187:194.

- Sulastri, Erlidawati, Syahrial, Nazar,M., Andayani, T. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L.*) Hasil Budidaya Daerah Saree Aceh Besar. *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*. Vol 9 : 125-130.
- Suleyman, H., Demircan,B., Karagoz, Y. 2007. Anti-Inflammatory and Side Effects of Cyclooxygenase Inhibitor. *Pharmacological Reports*.(59) : 247-258.
- Sumardika, W.I. dan Jawi, I.M. 2012. Ekstrak Air Daun Ubi Jalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid dan Meningkatkan Kadar SOD Darah Tikus yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *Medicina : Volume 43 No. 2*.
- Takeuchi, K., Tanaka, A., Ohno, R., Yokota, A. 2003. Role of COX Inhibition Pathogenesis of NSAID-Induced Small Intestine Damage. *Journal of Physiology And Pharmacology* :165-182.
- Taiwo, V.O and Conteh, O.L. 2008. The Rodenticidal Effect of Indomethacin :Pathogenesis and Pathology. *Veterinarski Arhiv* 78(2) : 167-178.
- Tian, T., Wang,Z., Zhang, J. 2017. Pathomechanism of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies. *Hindawi. Volume 2017 : 1-19*.
- Veza, T., Nogales, A.R., Algieri, F., Utrilla, M.P., Cabezas, M.E.R., Galvez, J. 2016. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease : A Review. *MDPI : 1-22*.
- Vielhauer, V and T.N. Mayadas. 2007. *Function of TNF and Its Receptors in renal Disease: Distict Roles in Inflammatory Tissue Injury and Immune Regulation. Seminar in Nephrology*, 27 (3) : 286-308.
- Werdhasari, A. 2014. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*. Volume 3.2 : 59-68.
- Yeo, C.J., Matthews, J.B., McFadden, D.W., Pemberton, J.H., Peters, J.H. 2013. *Shackelford's Surgery of The Alimentary Tract*. China : Elsevier.
- Zosimo, M. 1999. *Sweetpotato Germplasm Management (Ipomoea batatas) Training Manual*. Peru: International Potato Center (CIP).
- Zhang, H.Y. 2001. *Structure Activity Relationships and Rational Design Startegies for Radical Scavenging Antioxidants*. Computer Aided Drug Design . 1: 257-273.
- Zhao,M., Zhu, W., Gong,J., Zuo, L., Zhao,J., Sun,J., Li,N., Li, J., 2015. Dietary Fiber Intake is Associated with Increased Colonic Mucosal GPR43+ Polymorphonuclear Infiltration in Active Chron's Disease. *Nutrients* : 5327-5346.